

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Etude du facteur de transcription CHOP10/GADD153 Dans les macrophages RAW264.7 exposés à Brucella abortus

LOBET, Elodie

*Award date:*  
2012

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

## **Etude du facteur de transcription CHOP10/GADD153 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *Brucella abortus***

LOBET Elodie

### Résumé

*B. abortus* est une bactérie intracellulaire facultative qui se réplique dans un compartiment dérivé du réticulum endoplasmique. Le mémoire est basé sur l'hypothèse qu'une colonisation du RE pourrait induire un stress de l'organe conduisant à l'activation de l'UPR (*Unfolded Protein Response*). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont montré que, parmi divers marqueurs de l'UPR testés dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*, CHOP10 est le seul marqueur dont l'abondance augmente en réponse à l'infection. L'induction de l'expression de ce facteur de transcription semble donc indépendante de la réponse UPR. De plus, il a été montré que CHOP10 est également et initialement exprimé dans des cellules qui ne contiennent pas la bactérie (N. Lebailly, Mémoire 2011).

Ce mémoire a permis d'apporter des résultats expérimentaux qui suggèrent que l'induction de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus* est causée par un mécanisme de communication intercellulaire, dans lequel, la bactérie induirait la production de médiateurs solubles par les cellules infectées susceptibles d'induire l'expression de CHOP10 dans les cellules. Nous avons identifié l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6, l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  comme des candidats potentiellement intéressants pour assurer cette communication moléculaire soluble. De plus, nos résultats suggèrent que, dans les conditions expérimentales étudiées, l'induction de l'expression de CHOP10 nécessite des bactéries vivantes et semble dépendre du système de sécrétion de type 4 de la bactérie. Enfin, nous avons montré que l'induction de CHOP10 en réponse à l'exposition à la bactérie n'est pas une réponse spécifique aux macrophages RAW264.7 puisqu'elle est aussi observée dans des cellules MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*).

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2012

**Promoteur:** Th. Arnould

**Copromoteurs :** JJ. Letesson – M. Raes



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, le professeur Thierry Arnould, pour ses conseils très instructifs. Ces dix mois de travail à ses côtés en été très enrichissants. Son enthousiasme envers les recherches que nous avons menées était très stimulant. Je le remercie également pour sa disponibilité tout au long de l'année, mais surtout lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie également Jean-Jacques Letesson pour ses conseils avisés.

J'aimerais également remercier l'ensemble des membres de l'URBC et de l'URBM pour m'avoir accueillie et fait confiance durant ces 10 mois de recherches. Travailler à vos côtés fut un réel plaisir grâce à la courtoisie dont chacun fait preuve au quotidien.

Ensuite, je voudrais dire un merci tout particulier à Andrée. Tu m'as aidé « à faire mes premiers pas » dans le laboratoire et m'a appris la majorité des techniques que je maîtrise aujourd'hui. Tu m'as transmis ta rigueur scientifique et j'espère garder ces habitudes tout au long de ma carrière. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi. Profite bien de ta nouvelle vie !

Je remercie Nicolas pour les données préliminaires qu'il a généré et sur lesquelles nous avons basé nos hypothèses de travail, mais aussi pour les manip' que tu as réalisé...

Je tiens à remercier Isabelle Hamer pour sa disponibilité tout au long de cette année.

Je voudrais également remercier les mémorants avec qui j'ai passé cette année. Merci pour la bonne humeur qu'ils dégageaient au quotidien ainsi que pour leur soutien dans les moments difficiles.

Enfin, un dernier merci, mais pas le moindre, à mes proches, pour le soutien qu'ils m'ont apporté lors de cette rédaction. Et plus particulièrement à mes parents pour m'avoir permis de réaliser des études et pour m'avoir toujours encouragé. Merci à toi Geoffrey pour ton aide logistique mais surtout pour ton écoute et ton soutien au quotidien...



## Abréviations

AARE	Amino-acid response element
ABS	Albumine bovine sérique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AP-1	Activating protein 1
APC	Adenomatous polyposis coli
ARN	Acide ribonucléique
ATF6	Activating transcription factor-6
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCA	Acide bicinchoninique
BCl-2	B-cell lymphoma-2
BCV	Brucella containing vacuole
BiP	Immunoglobulin binding protein
BL3	Biosecurity level 3
BLS	Brucella lumazine synthase
BMDM	Bone marrow derived macrophages
bZIP	Basic-leucine zipper
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II
CD	Cellule dendritique
CDC42	Cell division cycle 42
CFU	Colony forming unit
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
CK2	Casein kinase-2
CMVH	Cytomégalo virus humain
COPII	Coat protein II
CPAP	Cellule présentatrice d'antigène professionnelle
CR1	Complement receptor-1
CREP	Constitutive repressor of eIF2 phosphorylation
Ct	Cycle threshold
CVB3	Coxsackievirus B2
Ddit3	DNA damage inducible transcript
DO	Densité optique
DR5	Death receptor 5
EDEM	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEA-1	Early Endosome Antigen 1
eIF2 $\alpha$	Eukariotic Initiation Factor -2 $\alpha$
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated degradation
ERES	ER exit site
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment



Ero1 $\alpha$	ER oxidase 1 $\alpha$
ERSE	ER stress response element
ESAT-6	6 kDa early secretory antigenic target
FcR	Fc Receptor
Fz	Frizzled
GADD153	Growth arrest DAN damages -153
GADD34	Growth arrest DAN damages -34
GAP	GTPase activating protein
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCN2	General control nonrepressible-2
GDP	Guanosine-5'-diphosphate
GEF	guanine exchange factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRP78	Glucose-regulated protein 78
GRP94	Glucose-regulated protein 94
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCV	Hepatitis C virus
HERP	Homocysteine-induced ER protein
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HRI	Heme-regulated inhibitor
HRP	Horseradish peroxidase
ICP34.5	Infected cell protein 34.5
IFN $\gamma$	Interféron $\gamma$
IHF	Integration host factor
IL-12	Interleukine - 12
iNOS	inducible Nitric oxide Synthase
IP3R1	Receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate
IRG	Immunity related GTPases
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein -1
LAP	Liver-enriched activator protein
LIP	Liver-enriched inhibitory protein
LLO	Listeriolysin O
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin-rich repeat
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDC	MonoDansylCadaverine
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MHC	Major histocompatibility complex
miRNA	Micro-RNA
MOI	Multiplicity of infection
mtROS	ROS mitochondriaux





NF-Y	Nuclear transcription factor Y
NF-KB	Nuclear factor - KB
NOX	NADPH oxidase
OMP	Outer membrane protein
ORF	Open reading frame
PAMP	pathogen associated mollecular pattern
PBS	Phosphate buffer saline
PDI	protein disulfide isomerase
PDI-P5	protein disulfide isomérase P5
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PFA	Paraformaldéhyde
PI	Posit-infection
PI-PLC	Phosphatidyl-inositol phospholipase C
PKR	Double stranded RNA-induced protein kinase
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator associated recpetor $\gamma$
ppp1r15a	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RE	Réticulum endoplasmique
RicA	Rab2 interacting conserved protein A
RILP	Rab-interacting lysosomal protein
RISC	RNA induced silencing complex
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SIN-1	SAPK-interacting protein 1
siRNA	Small interfering RNA
SodC	SuperOxyDismutase - C
SREBP1	Sterol regulatory element binding proteins
SV40	Simian virus-40
SVF	Sérum veau foetal
SVFi	Sérum veau foetal inactivé
T4SS	Système de sécrétion de type 4
T75	Boîte de culture cellulaire de 75 cm <sup>2</sup>
TCF	T-cell factor
TCR	T-cell receptor
TG	Thapsigargine
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like recpetor
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor - $\alpha$
TRAIL-R2	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-2



TRB3	Tribbles homolog 3
Trl	T-RNA ligase
UPR	Unfolded Protein Response
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
XBP1	X binding protein 1
ZIP	Leucin-zipper
β-cat	β-caténine



<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
I. <i>BRUCELLA</i> .....	9
1.1. <i>La brucellose</i> .....	9
1.2. <i>Brucella abortus</i> .....	10
1.3. <i>Etapes d'une infection par Brucella abortus</i> .....	10
1.4. <i>Adaptations à l'infection chronique</i> .....	14
II. LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	19
2.1. <i>Structure et fonction dans la cellule eucaryote</i> .....	19
2.2. <i>L'UPR</i> .....	19
2.3. <i>UPR et infection</i> .....	21
III. CHOP10 .....	23
3.1. <i>Famille des C/EBPs</i> .....	23
3.2. <i>CHOP10 ou GADD153</i> .....	24
3.3. <i>Régulation de CHOP10</i> .....	24
3.4. <i>Gènes régulés par CHOP10 et implication du facteur de transcription dans de nombreux processus biologiques</i> .....	26
IV. <i>DONNEES PRELIMINAIRES ET OBJECTIFS DU MEMOIRE</i> .....	30
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>32</b>
1. <i>CULTURES CELLULAIRES</i> .....	32
1.1. <i>Cellules eucaryotes</i> .....	32
1.2. <i>Souches bactériennes</i> .....	33
2. <i>PROCEDURE D'INFECTION CELLULAIRE</i> .....	33
2.1. <i>Procédure classique</i> .....	33
2.2. <i>Infection par des bactéries mortes</i> .....	33
2.3. <i>Contrôles CFU réalisés</i> .....	34
3. <i>ANALYSE DE L'ABONDANCE DES PROTEINES PAR LA TECHNIQUE DU WESTERN BLOT EN FLUORESCENCE</i> .....	34
3.1. <i>Principe</i> .....	34
3.2. <i>Préparation des lysats cellulaires</i> .....	34
3.3. <i>Dosage de protéines par la méthode de Pierce</i> .....	35
3.4. <i>Electrophorèse</i> .....	35
3.5. <i>Transfert</i> .....	35
3.6. <i>Révélation et quantification de la protéine d'intérêt</i> .....	35
4. <i>RT-QPCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL</i> .....	36
4.1. <i>Principe</i> .....	36
4.2. <i>Extraction d'ARN</i> .....	36
4.3. <i>Dosage de l'ARN</i> .....	37
4.4. <i>Transcription reverse</i> .....	37
4.5. <i>Real-time PCR</i> .....	37
5. <i>IMMUNOCYTOCHIMIE ET OBSERVATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE</i> .....	37
5.1. <i>Principe</i> .....	37
5.2. <i>Méthode</i> .....	38
6. <i>PRÉPARATION ET UTILISATION DE MILIEUX CONDITIONNÉS</i> .....	38
6.1. <i>Principe</i> .....	38
6.2. <i>Méthode</i> .....	38
7. <i>INCUBATION DES CELLULES NAÏVES AVEC LES MILIEUX CONDITIONNES</i> .....	38
8. <i>DOSAGE DES CYTOKINES DANS LES MILIEUX CONDITIONNES PAR LA TECHNIQUE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)</i> .....	39
8.1. <i>Principe</i> .....	39
8.2. <i>Méthode</i> .....	39
9. <i>TRANSFECTION DES CELLULES RAW264.7 AVEC DES SIRNA DIRIGES CONTRE L'ARNM DE CHOP10</i> ...	40
9.1. <i>Principe</i> .....	40
9.2. <i>Méthode</i> .....	41
10. <i>TRANSFECTION DES CELLULES RAW264.7 AVEC DES PLASMIDES RAPORTEURS-LUCIFERASE</i> .....	41



10.1. Principe.....	41
10.2. Méthode.....	41
<b>RESULTATS.....</b>	<b>43</b>
PARTIE 1 : CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DE CHOP10 DANS LES MACROPHAGES RAW264.7	
EXPOSES A <i>BRUCELLA</i> . ....	43
1. Abondance de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposées à <i>B. abortus</i> .....	43
2. Localisation subcellulaire de CHOP10 et homogénéité de la réponse d'induction du gène <i>Ddit3</i> .....	44
3. Activité trans-activatrice de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à <i>B. abortus</i> .....	45
4. Expression de CHOP10 dans d'autres types cellulaires eucaryotes exposés à <i>B. abortus</i> .....	45
5. Expression de CHOP10 dans des macrophages RAW264.7 exposés à d'autres souches ou mutants de <i>Brucella</i> . ....	46
PARTIE 2 : ETUDE DES MECANISMES D'INDUCTION DE CHOP10 DANS LES MACROPHAGES RAW264.7	
EXPOSES A <i>BRUCELLA ABORTUS</i> .....	47
1. Recherche de l'implication de facteurs de transcription activés lors de la réponse UPR dans l'induction de CHOP10 observée dans les macrophages RAW264.7 exposés à la bactérie .....	47
3. Etude de l'effet du mutant <i>virB</i> sur l'expression de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 .....	50
4. Recherche de l'existence d'une communication soluble intercellulaire.....	51
5. Quantification de l'abondance de diverses cytokines connues pour être sécrétées par des macrophages infectés .....	52
PARTIE 3 : ETUDE PRELIMINAIRE VISANT A RECHERCHER LA OU LES FONCTION(S) REMPLIES PAR CHOP10 DANS LES MACROPHAGES RAW264.7 EXPOSES A <i>B. ABORTUS</i> . ....	54
1. Mise au point de l'invalidation de CHOP10 à l'aide de siRNA .....	54
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>64</b>
1. BIBLIOGRAPHIE ASSOCIEE AU TEXTE .....	64
2. BIBLIOGRAPHIE ASSOCIEE AUX FIGURES .....	76





### I. *Brucella*

#### 1.1. La brucellose

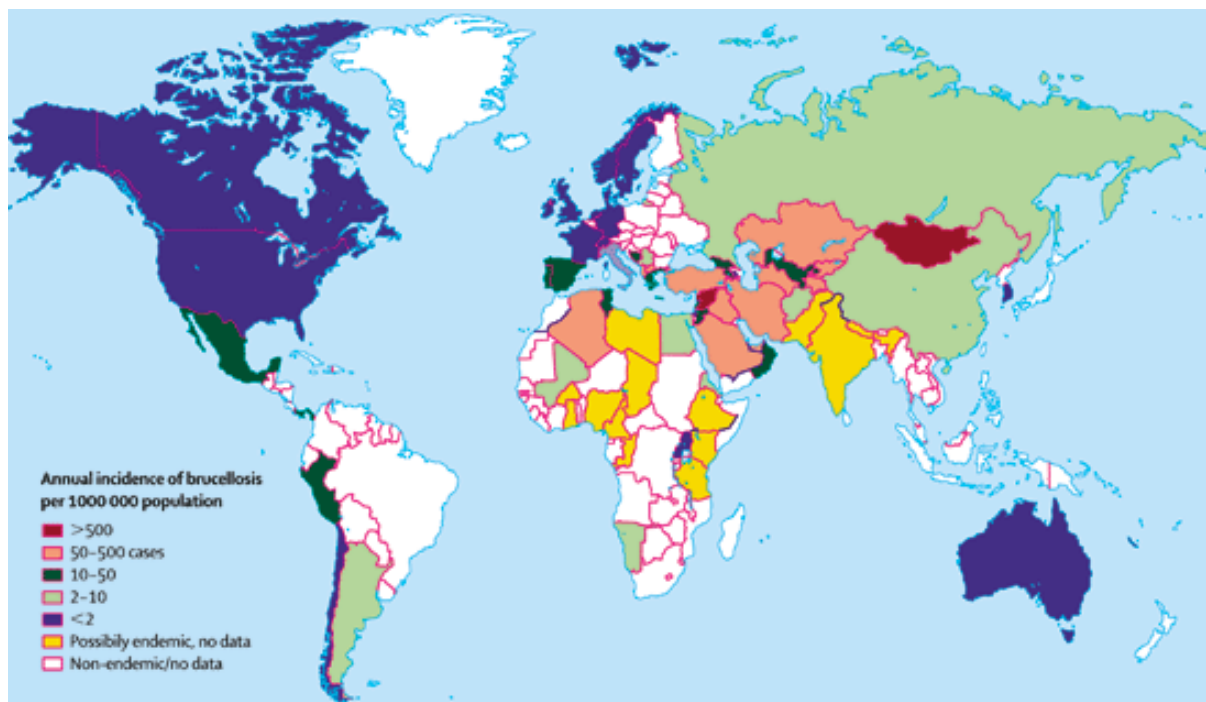
La brucellose est une zoonose, c'est-à-dire une maladie susceptible d'être transmise de l'animal à l'homme. Avec, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 500000 cas déclarés chaque année, la brucellose est la zoonose la plus répandue dans le monde<sup>1</sup>. Elle est causée par les bactéries du genre *Brucella*, un coccobacille gram négatif. C'est David Bruce, un médecin de l'armée britannique qui isola pour la première fois l'agent responsable de la maladie chez des soldats britanniques atteints d'une maladie encore inconnue alors appelée Fièvre de Malte.

La maladie touche principalement les bovins, caprins et ovins, mais les différentes espèces de *Brucella* sont capables d'infecter la majorité des mammifères, qu'ils soient de laboratoire, domestique ou sauvage. Au sein du genre *Brucella*, 4 espèces sont pathogènes pour l'homme, il s'agit de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* et plus rarement, *B. canis*<sup>1</sup>. Dans le cadre de ce mémoire nous avons centré nos recherches sur *B. abortus*.

La bactérie peut se transmettre à l'homme soit de manière directe lors de contacts étroits avec des tissus infectés comme lors d'une mise bas d'un fœtus infecté ou de manière indirecte suite à la consommation de produits laitiers non pasteurisés dérivés d'un animal infecté<sup>2</sup>. En effet, la bactérie est capable d'envahir l'organisme via les voies orale et respiratoire sous forme d'aérosols, mais aussi de traverser les muqueuses. La transmission d'homme à homme est cependant un phénomène très rare<sup>2</sup>. L'homme est donc un hôte accidentel de la bactérie puisqu'il ne permet pas, ou très rarement, la propagation de l'infection.

Les manifestations cliniques de la maladie sont dépendantes de l'hôte infecté. Chez les hôtes naturels, l'infection va engendrer une maladie chronique caractérisée par des avortements et des stérilités causés par le tropisme de la bactérie pour les cellules du trophoblaste et du tractus génital<sup>3</sup>. Chez l'homme, *Brucella* est responsable d'une maladie caractérisée des symptômes similaires à ceux d'une grippe c'est-à-dire une fièvre ondulante, un malaise général, une transpiration excessive, etc. L'ensemble de ces symptômes assez communs rend son diagnostic difficile. Si elle n'est pas traitée à l'aide d'antibiotiques adéquats, souvent une combinaison de plusieurs antibiotiques à base de doxycycline et de rifampine, la maladie peut évoluer vers des localisations osseuse, articulaire voir cérébrale et un état débilitant caractérisé de « patraquerie » brucellique<sup>4</sup>.

Etant donné le faible taux de transmission de la maladie entre des individus humains, la prévention de la brucellose chez l'homme dépend de l'éradication de la maladie chez les animaux hôtes. Si des vaccins prophylactiques existent pour le bétail, un tel type de vaccin n'est pas encore disponible pour l'homme. Ces vaccins sont fabriqués à partir de souches vaccinales vivantes atténuées mais qui sont tout de même capables de provoquer des avortements chez les animaux gestants<sup>5</sup>. De plus, l'éradication de la maladie n'est envisageable que si la vaccination est associée à des mesures sanitaires strictes. En effet, un des seuls moyens de contenir l'infection de manière efficace lorsqu'un animal est infecté est l'éradication du cheptel, ce qui évidemment représente un coût économique énorme. Pour éviter la transmission de la bactérie, de l'animal infecté à l'homme, le traitement des produits laitiers est primordial.



**Figure 1.1. Incidence mondiale de la Brucellose.**

Les régions les plus touchées sont l'Amérique centrale, le bassin méditerranéen, le Moyen Orient et l'Asie orientale (Pappas et al, 2006<sup>1</sup>).

Différentes caractéristiques de l'infection par *Brucella spp.*, telles que son mode de transmission par aérosols, l'induction d'une maladie chronique difficile à diagnostiquer et nécessitant un traitement antibiotique lourd, sont responsables du classement de *Brucella* dans la catégorie des pathogènes potentiellement utilisables comme arme biologique. Cependant, le développement de traitements efficaces, le faible taux de mortalité généré et surtout l'apparition d'armes biologiques bien plus meurtrières ont fait de *Brucella* une arme désuète<sup>1</sup>. Si la maladie est actuellement éradiquée en Belgique depuis le début des années 2000 (Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire), elle reste un problème économique majeur dans les pays en voie de développement où les programmes de vaccinations et le traitement des produits laitiers ne sont pas systématiques<sup>4</sup> (Figure 1.1.). De plus, la mobilité croissante des personnes pourrait être responsable de la réapparition de la maladie dans les pays industrialisés, ce qui justifie la poursuite de l'étude des mécanismes moléculaires régissant l'infection afin de pouvoir proposer de nouvelles cibles thérapeutiques ou de développer des souches vaccinales plus performantes.

## **1.2. *Brucella abortus***

*Brucella abortus* est une bactérie gram négative intracellulaire facultative. *In vitro*, elle est capable d'infecter tous les types cellulaires testés en infections expérimentales, que ce soit des phagocytes professionnels tels que des macrophages et des cellules dendritiques ou des phagocytes non professionnels tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales ou les trophoblastes. Cependant, *in vivo*, lors d'une infection naturelle de chèvres et de bétail, les bactéries sont retrouvées au niveau du système reproducteur, des mamelles, des ganglions lymphatiques supra-mammaires, dans les trophoblastes, les neutrophiles et les macrophages<sup>6-10</sup>.

Les cellules épithéliales les plus pertinentes à étudier sont les trophoblastes, or la majorité des études *in vitro* réalisées sur des cellules épithéliales utilisent les cellules HeLa physiologiquement éloignées des cellules épithéliales cibles.

Dans le cadre de ce mémoire, nous étudierons donc le processus d'infection au sein de cellules phagocytaires. Il serait bien sur plus pertinent biologiquement de travailler sur des cellules non immortalisées, c'est-à-dire des lignées primaires et ce, puisque l'immortalisation va modifier des processus physiologiques au sein de la cellule. Cependant, l'utilisation quotidienne des lignées primaires pour les expériences de routine étant très contraignante, nous avons choisi de travailler sur des macrophages immortalisés tout en gardant à l'esprit, qu'à plus long terme, il serait intéressant/nécessaire de confirmer les résultats clés sur des macrophages primaires. Nous avons choisi de travailler avec la lignée RAW264.7, une lignée de macrophages murins immortalisés à l'aide du virus de Abelson<sup>11</sup> car elle est très couramment utilisée et permet donc une comparaison plus aisée de nos résultats avec la littérature. De plus ces cellules sont très pratiques car facilement amplifiables, supportant les transfections d'ARN et sensibles à l'interférence ARN.

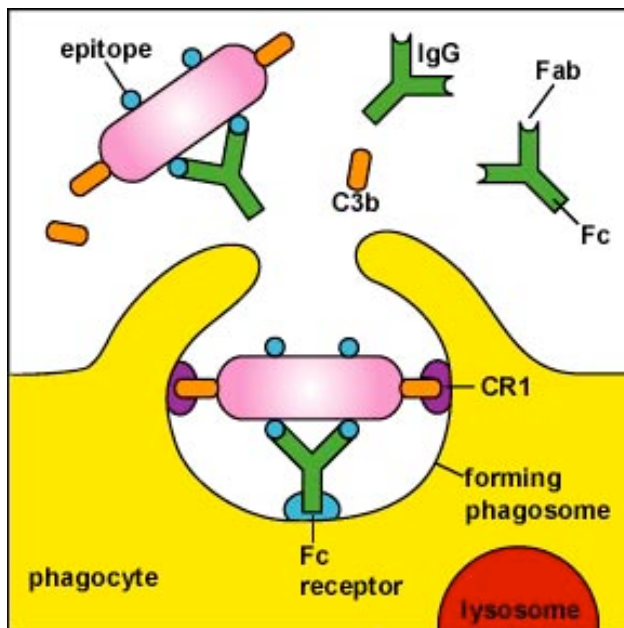
Une infection est toujours le résultat d'interactions entre l'hôte et le pathogène. L'importance de ces interactions est accrue lorsqu'il s'agit d'une infection chronique comme c'est le cas pour *Brucella spp.* Tout au long de cette introduction, nous allons analyser les différentes étapes d'une infection par *Brucella* en tentant de mettre en évidence les acteurs moléculaires bactériens et cellulaires qui régissent ces interactions, ainsi que les adaptations mises en place par la bactérie pour résister aux moyens de défense développés par l'hôte.

## **1.3. Etapes d'une infection par *Brucella abortus***

### **1.3.1. Internalisation de la bactérie**

Une fois à l'intérieur de son hôte, *Brucella* est internalisée par un processus d'endocytose<sup>6</sup>. Il existe deux modes d'entrée différents distingués sur base du fait que la





**Figure 1.2. Mode d'entrée d'une bactérie opsonisée.**

Le processus d'opsonisation consiste en un marquage des pathogènes par les anticorps et/ou le peptide C3b provenant de la cascade d'activation du complément. Ces éléments vont faciliter la phagocytose et la destruction du pathogène par l'intermédiaire des récepteurs aux fragments constants des anticorps et du récepteur CR1.

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/antibody/u3fg18b.html> Visité le 14 novembre 2011

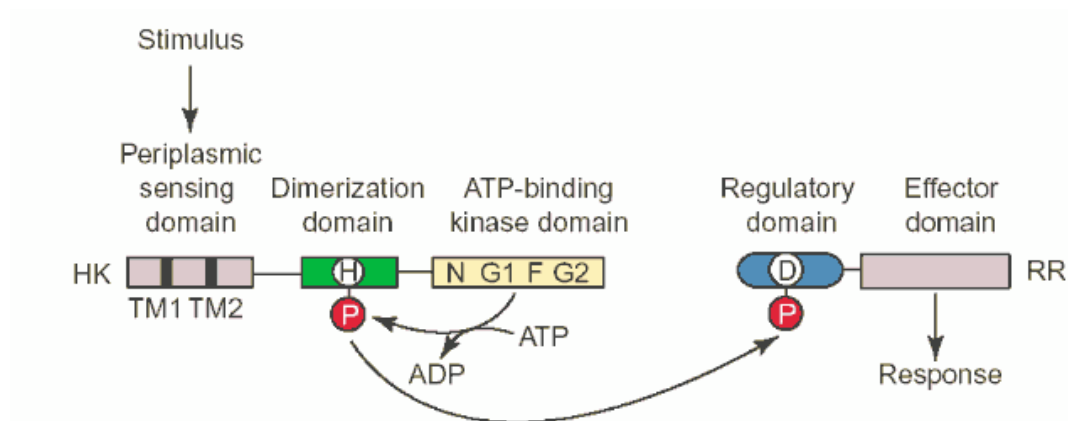
## BOITE 1

### **BvrR/BvrS, un système à deux composantes impliqué dans l'internalisation de *Brucella***

Un système à deux composants est comme son nom l'indique composé de deux protéines agissant de concert. Il s'agit d'un senseur à activité histidine kinase, ici BvrS et d'un effecteur possédant un aspartate conservé et pouvant se lier à l'ADN et ainsi moduler l'expression de différents gènes cibles, ici BvrR.

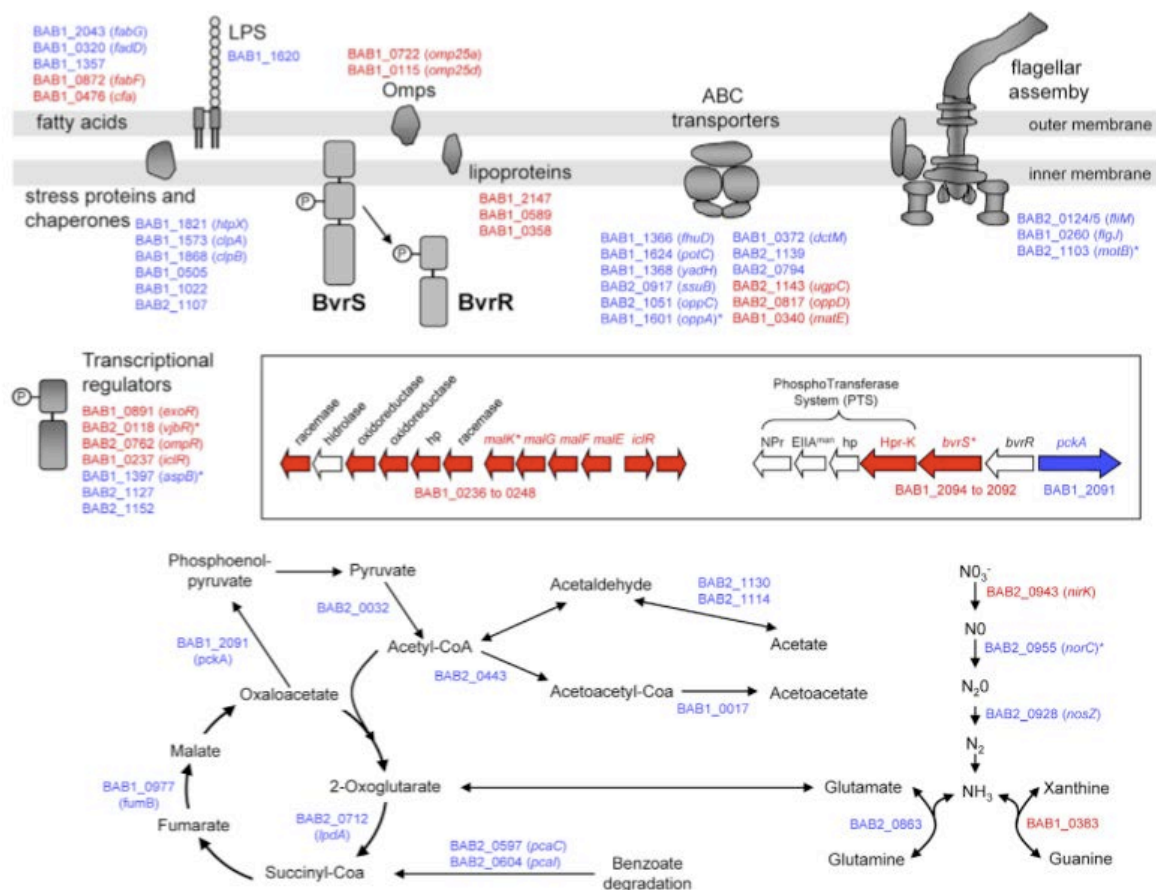
BvrS est une protéine transmembranaire située au niveau de la membrane plasmique. Elle comprend différents domaines : à l'extrémité N-terminale se trouve un domaine senseur situé dans le périplasme. Celui-ci est suivi d'un domaine transmembranaire. Au niveau du cytoplasme, on trouve un domaine de dimérisation contenant une histidine conservée. Enfin, à l'extrémité C-terminale, un domaine kinase capable de lier et d'hydrolyser l'ATP afin de phosphoryler l'histidine conservée est présent<sup>3</sup>. BvrR, la protéine effectrice du système est composée d'un domaine transactivateur et d'un domaine de liaison à l'ADN. Elle possède un aspartate conservé qui, une fois phosphorylé, va activer la protéine<sup>3</sup>. La perception d'un stimulus par le domaine senseur de BvrS va induire une autophosphorylation de l'histidine conservée. BvrS va ensuite transférer ce phosphate sur l'aspartate du BvrR et permettre son activation. BvrR une fois active modulera l'expression de nombreux gènes cibles (Figure 1.3.).

Une étude comparative à haut débit des transcriptomes de bactéries sauvages et de bactéries mutées pour BvrR a permis d'identifier 127 gènes régulés, directement ou indirectement, par ce système à deux composants. L'analyse de ces différents gènes a montré que BvrR/BvrS est impliqué dans la régulation de la composition de l'enveloppe externe de la bactérie, du métabolisme du carbone et de l'azote<sup>6</sup> (Figure 1.4.). Il semble donc que ce système soit impliqué dans le « switch » métabolique observé lors du passage d'un environnement extracellulaire à un environnement intracellulaire et donc, de manière plus générale, dans la virulence de *Brucella*<sup>6</sup>.



**Figure 1.3. Fonctionnement d'un système à deux composants.**

Lorsqu'un stimulus est perçu par le domaine senseur de l'histidine kinase, le domaine kinase de celle-ci va permettre le transfert d'un phosphate de l'ATP à l'histidine conservée située dans son domaine de dimérisation, puis son transfert sur l'aspartate conservé du régulateur de réponse. Une fois phosphorylé ce-dernier va acquérir son activité de régulateur transcriptionnel (West and Stock, 2001<sup>5</sup>).



**Figure 1.4. Gènes régulés par le système à deux composants BvrR/BvrS**

Les gènes régulés négativement par le système à deux composants sont indiqués en bleu et ceux qui sont régulés positivement indiqués en rouge. Les gènes notés d'un astérisque sont des gènes qui ont été montrés précédemment comme étant impliqués dans la virulence de *Brucella* (Viadas et al., 2010<sup>6</sup>).

bactérie est reconnue ou non par le système immunitaire. En effet, les bactéries opsonisées vont entrer par l'intermédiaire de l'interaction qui existe, respectivement, entre les opsonines (complément et/ou anticorps) et leur récepteur (CR1 (*Complement receptor-1*) et FcR (*Fc Receptor*)) (Figure 1.2.), alors que les bactéries non opsonisées vont pénétrer dans la cellule hôte par une interaction entre différentes adhésines et leurs récepteurs situés au niveau des radeaux lipidiques<sup>12</sup>. Ceci est très important car il semble que le mode d'entrée utilisé par la bactérie influence son destin une fois à l'intérieur de la cellule hôte. Il a été montré que dans les phagocytes professionnels, les bactéries internalisées via les récepteurs immunologiques ont une plus grande probabilité d'être détruites que les bactéries non opsonisées<sup>13-15</sup>. Le trafic intracellulaire de la bactérie semble donc être dépendant du mode d'entrée de cette dernière au sein de ses cellules hôtes<sup>16</sup>. Etant donné que la majorité des bactéries qui vont être capables de se répliquer *in fine* entrent par une voie dépendante des récepteurs situés au niveau des radeaux lipidiques, nous allons uniquement détailler ce mode d'entrée.

L'internalisation est un processus qui débute par une interaction entre des composants membranaires bactériens et cellulaires. Bien que les mécanismes régissant l'internalisation des bactéries non opsonisées ne soient pas encore complètement élucidés, différents composants tant bactériens qu'eucaryotes nécessaires à ce mode d'internalisation ont été identifiés. Du côté bactérien, il a été montré chez *B. suis* que la chaîne O du LPS (lipopolysaccharide) est nécessaire à l'internalisation par les radeaux lipidiques<sup>12</sup>. De même, différents composants des radeaux lipidiques de la cellule hôte sont nécessaires à l'internalisation de *Brucella*. C'est le cas par exemple du cholestérol, du ganglioside GM1 et de protéines à ancrage GPI (*glycosylphosphatidylinositol*). En effet, suite à un traitement des cellules avec différentes drogues/molécules telles que la  $\beta$ -méthylcyclodextrine qui extrait le cholestérol des membranes, la filipine ou la nystatine, qui se lie au cholestérol, la toxine du choléra, qui lie les gangliosides et enfin, la PI-PLC (*phosphatidylinositol phospholipase C*) connue pour extraire les protéines ancrées par une ancre GPI de la membrane, l'internalisation de *Brucella* est uniquement due à l'opsonisation des bactéries<sup>17</sup>.

Un récepteur « scavenger » de type A retrouvé au niveau des radeaux lipidiques, a également été montré comme étant nécessaire à l'internalisation de *Brucella*<sup>18</sup>.

Une fois la première interaction réalisée, différentes modifications sont engendrées dans la cellule hôte. Bien qu'aucune modification de la morphologie globale du cytosquelette ne soit observée, il semble que la dynamique des microfilaments d'actine et des microtubules soit nécessaire à l'internalisation de la bactérie<sup>19,20</sup>. En effet, il semble que différentes petites GTPases impliquées dans la dynamique du cytosquelette comme RhoA, Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate -1*) et Cdc42 (*Cell-division cycle-42*) sont nécessaires à l'internalisation de la bactérie via les radeaux lipidiques. D'une part, il a été montré que Cdc42 est activée suite à l'interaction entre la bactérie et la cellule hôte<sup>21</sup>. D'autre part, un traitement au TcdB-1470, un inhibiteur des GTPases RhoA et Rac1, inhibe l'internalisation de la bactérie<sup>20</sup>. L'implication de ces protéines dans l'internalisation d'autres bactéries intracellulaires telles que *Shigella*, a également déjà été montrée<sup>22</sup>. Ce phénomène semble être dépendant du système à deux composantes BvrR/BvrS puisque les mutants pour ce système sont incapables d'activer la petite GTPase<sup>23</sup>. Pour plus d'informations sur ce système à deux composantes, voir la Boîte 1.

### 1.3.2. Trafic intracellulaire

Lors d'une infection expérimentale *in vitro*, on remarque que seulement 15 à 30 % des cellules contiennent la bactérie à un temps de 48 h post-infection (PI)<sup>21</sup>. Cette observation peut être expliquée par différentes hypothèses. Premièrement, les cellules ne sont peut-être pas toutes infectées au départ. Deuxièmement, si un plus grand nombre de cellules était





infecté initialement, seule une faible proportion des bactéries sont capables de survivre au sein de la cellule une fois internalisées.

Une fois internalisée, *Brucella* est contenue dans un phagosome modifié appelé BCV (*Brucella containing vacuole*). Des études de microscopie en immunofluorescence et de microscopie électronique ont montré que la BCV interagit avec les constituants précoces de la voie endosomale et acquière par la suite, jusqu'à 12 h PI, LAMP-1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*), un marqueur des composants tardifs de cette même voie<sup>24,25</sup>. Au sein de phagocytes professionnels, la majorité des bactéries internalisées va être détruite au cours des 4 à 8 premières heures d'infection<sup>12,24,26</sup>. La BCV, d'une petite proportion de bactéries, va ensuite être capable d'interagir avec les sites de sortie du réticulum endoplasmique (RE) (ERES – *endoplasmic reticulum exit sites*) et ainsi permettre sa fusion avec le RE puis l'établissement d'une niche répliquative<sup>24,25</sup>. En effet, des études ont montré que la BCV va acquérir la calnexine, un marqueur du RE, à 4 h post-infection (37 % des BCV sont positives pour la calnexine) et la quantité de BCV positives va augmenter au cours du temps (66 % à 12 h PI et 91 % à 24 h PI). Des résultats comparables ont été obtenus pour d'autres marqueurs du RE tels que Sec61 $\beta$  et la calreticuline<sup>24</sup>. On va alors observer, simultanément, une exclusion progressive du marqueur lysosomal LAMP-1<sup>27</sup>. L'interprétation de la localisation transitoire du marqueur d'endosomes tardifs au niveau des BCVs est controversée. Deux modèles ont été proposés pour tenter de l'expliquer.

Un premier modèle proposé par Pizzaro-Cerda en 2000 suggérait que la bactérie interagit uniquement avec les endosomes précoces et se ségrège rapidement de la voie endosomale afin d'éviter la fusion avec les lysosomes<sup>28</sup>. Ce modèle est basé d'une part sur des observations en microscopie à fluorescence suggérant que LAMP-1 est le seul marqueur lysosomal retrouvé au niveau de la BCV. En effet, différentes expériences n'ont pas pu mettre en évidence des marqueurs solubles de lysosomes pré-chargés<sup>12</sup> ou d'enzymes luminales telles que la cathepsine D<sup>24,25,29</sup>. De même, des observations en microscopie électronique n'ont pas pu montrer de fusion des BCV avec des lysosomes pré-chargés en albumine sérique bovine marqués à l'aide de particules d'or<sup>30</sup>. Le modèle proposait donc une ségrégation rapide de la BCV de la voie endosomale afin d'éviter la fusion avec le lysosome. Les auteurs ont donc proposé une hypothèse pour expliquer la présence de LAMP-1 au niveau de la BCV et ont suggéré que le marqueur se retrouverait au niveau de la BCV « par erreur ». En effet, en analysant le trafic de ce marqueur, il semble qu'une partie de celui-ci est d'abord envoyé à la membrane plasmique avant de rejoindre le lysosome<sup>21</sup>.

En 2008, Starr et collaborateurs ont proposé un second modèle. En effet, un des arguments sur lequel s'appuyait le modèle précédent était l'absence de marqueurs d'endosomes tardifs autres que LAMP-1 dans la BCV. Une étude visant à étudier la vacuole contenant *Salmonella* a montré que l'absence de détection d'antigènes solubles tels que les marqueurs de pré-charge des lysosomes en microscopie à fluorescence ou en microscopie électronique pouvait être due au traitement de fixation et de perméabilisation que subissent les cellules pour l'analyse (disparition de plus de 90 % du signal)<sup>31</sup>. Des études plus récentes en microscopie confocale à haute résolution sur cellules vivantes ont donc été réalisées afin d'éviter ce phénomène artefactuel causé par le traitement infligé aux cellules lors de la préparation de l'échantillon. Dans ces conditions, les auteurs ont pu mettre en évidence différentes observations qui suggèrent une fusion transitoire avec le lysosome.

Premièrement, ils ont mis en évidence la présence d'autres marqueurs lysosomaux au niveau de la vacuole, telles que Rab7, RILP (*Rab-interacting lysosomal protein*) ou encore des marqueurs pré-chargés dans la lumière lysosomale. Deuxièmement, des tests de *quenching* de

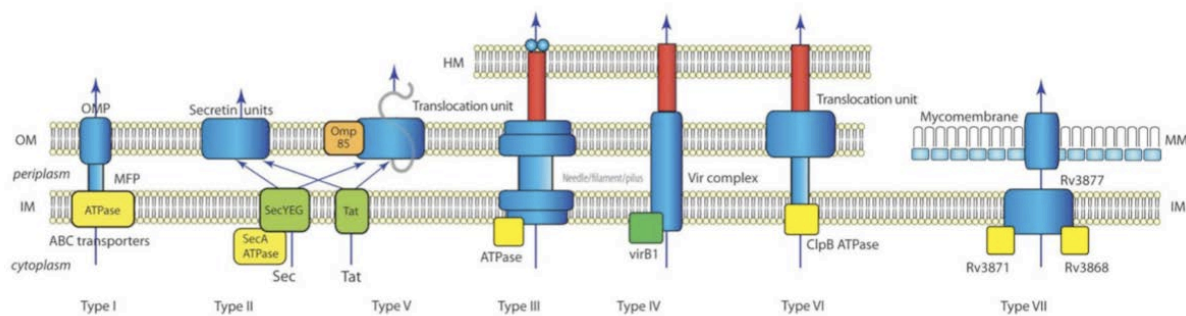
## BOITE 2

### virB, un système de sécrétion de type 4 primordial pour le trafic intracellulaire de la bactérie

Il existe différents systèmes de sécrétion. Le système de sécrétion de type 4 (T4SS) est un complexe multi protéique qui se trouve au niveau de l'enveloppe de bactéries gram positives ou négatives<sup>2</sup> (Figure 1.5.). Il existe 3 sous-classes de T4SS. Premièrement, les T4SS permettant le transfert d'ADN d'un cytoplasme d'une bactérie à celui d'une autre. Ce phénomène s'appelle la conjugaison et permet le transfert horizontal de gènes afin de permettre une adaptation rapide de la population bactérienne aux changements environnementaux. Ce genre de T4SS est, par exemple, retrouvé chez *H. pylori*<sup>4</sup>. Deuxièmement, il existe des T4SS qui permettent le transfert d'ADN du milieu extracellulaire dans le cytoplasme de la bactérie et inversement. Ce phénomène s'appelle la transformation et est aussi responsable d'un transfert de matériel génétique horizontal. Cette deuxième sous classe n'est actuellement retrouvée que chez deux genres de bactéries : *H. pylori* pour la prise de matériel et *N. gonorrhoeae* pour le relargage de matériel<sup>4</sup>. Et enfin, troisièmement, le T4SS permettant d'introduire des effecteurs de nature protéique, nucléique ou nucléoprotéique, directement dans le cytoplasme de la cellule hôte<sup>4,7</sup>.

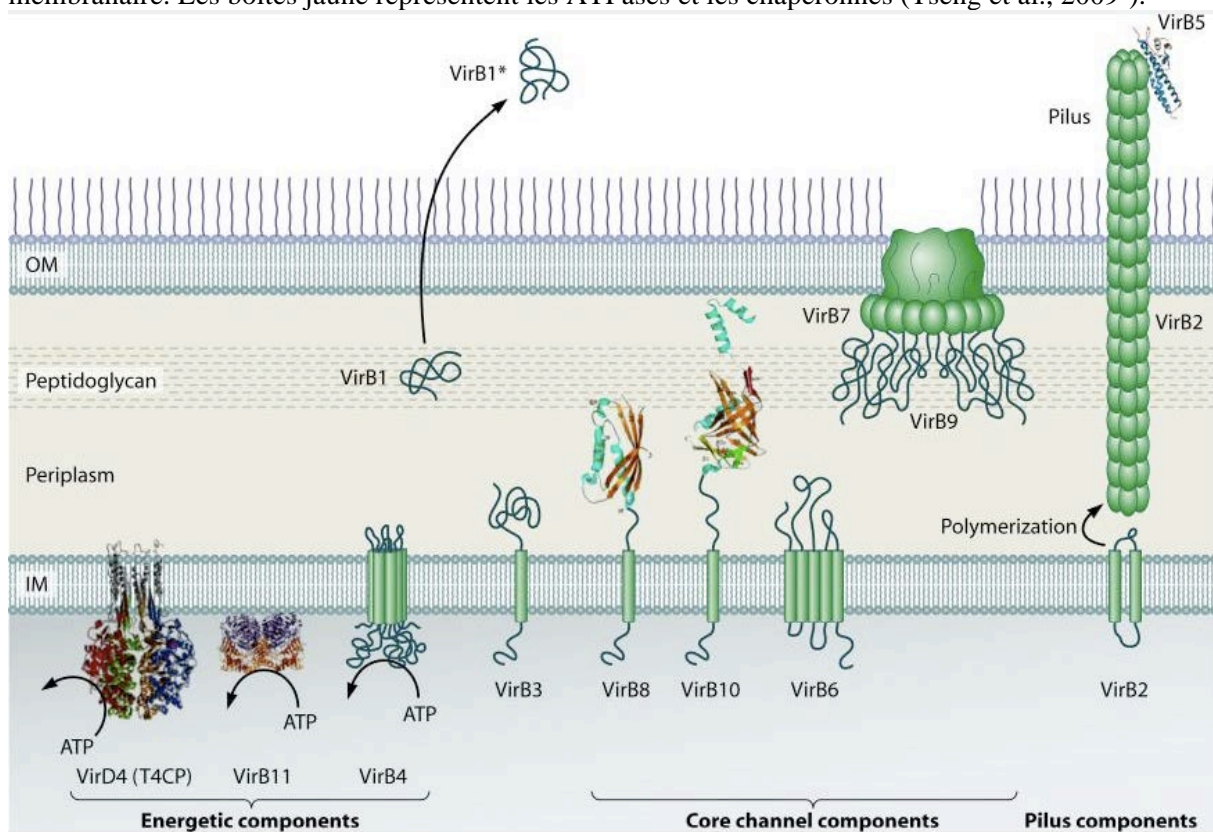
Le T4SS de *Brucella* a été découvert en 1999 chez *B. suis*<sup>8</sup>. Il fait partie de la troisièmement catégorie de T4SS. Ces systèmes sont communément retrouvés chez les bactéries pathogènes comme par exemple chez *Agrobacterium* et *Legionella*<sup>9</sup>. Ils sont essentiels pour la virulence de ces bactéries, c'est pourquoi ils font l'objet de nombreuses études en tant que cibles thérapeutiques<sup>9</sup>.

Le complexe protéique est formé de plus de 10 protéines (virB1 – virB12) qui vont s'assembler en un complexe transmembranaire. Le plus étudié étant le T4SS du pathogène de plante *Agrobacterium tumefaciens*<sup>10</sup>. Nous allons détailler la structure du T4SS de cet organisme (Figures 1.6. et 1.7.). Les différentes protéines de ce complexe peuvent être réparties en 3 classes : les protéines formant le cœur du complexe, c'est-à-dire le tunnel transmembranaire proprement dit, les protéines formant le pilus, c'est-à-dire le tunnel extracellulaire et, enfin, les protéines générant l'énergie nécessaire au passage des effecteurs à travers ces tunnels (Figures 1.6. et 1.7.).



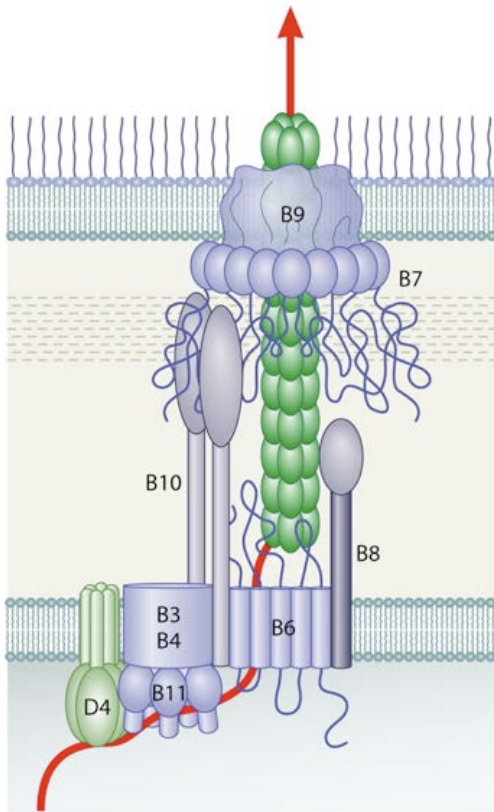
**Figure 1.5. Différents systèmes de sécrétion bactériens.**

Il existe 7 types de systèmes de sécrétion bactériens. Ces systèmes permettent soit la translocation d'effecteurs dans le milieu extracellulaire (types I, II et V) ou directement dans le cytoplasme d'une autre cellule (III, IV et VI). Le système de sécrétion de type VII est exprimé chez les mycobactéries qui possèdent une membrane de structure particulière appelée mycomembrane. *Brucella* possède un système de sécrétion de type 4, capable d'introduire des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule infectée. Abréviations HM : membrane de l'hôte, OM : membrane externe, IM : membrane interne, MM : mycomembrane, OMP : protéine de la membrane externe, MFP : protéine de fusion membranaire. Les boîtes jaunes représentent les ATPases et les chaperonnes (Tseng et al., 2009<sup>2</sup>).



**Figure 1.6. Différents composants du système de sécrétion de type 4 d'*Agrobacterium tumefaciens*.**

Le système de sécrétion d'*A. tumefaciens* est composé de 12 protéines virB1-11 et virD4 qui peuvent être classées en 3 catégories selon la fonction remplie par la protéine dans le complexe. Il s'agit des protéines formant les cœurs du complexe, c'est-à-dire le tunnel transmembranaire proprement dit, des protéines formant le pilus et enfin des protéines fournissant l'énergie nécessaire au transport de matériel protéique ou nucléique à travers le système (Alvarez-Martinez and Christie, 2009<sup>4</sup>).



**Figure 1.7. Structure du système de sécrétion de type 4 d'*Agrobacterium tumefaciens*.**

Une fois le système assemblé, il traverse les deux membranes des bactéries gram négatives. Trois protéines sont retrouvées en 14 exemplaires, il s'agit de VirB6, VirB7 et VirB9. Elles vont former une structure cylindrique de 18,5 nm de diamètre permettant le passage des substrats. Le trajet emprunté par ces substrats est indiqué par la flèche rouge (Alvarez-Martinez and Chrisite, 2009<sup>4</sup>).

fluorescence ont permis de mettre en évidence une activité protéolytique à l'intérieur de la BCV, semblable à celle retrouvée dans la lumière lysosomale<sup>32</sup>.

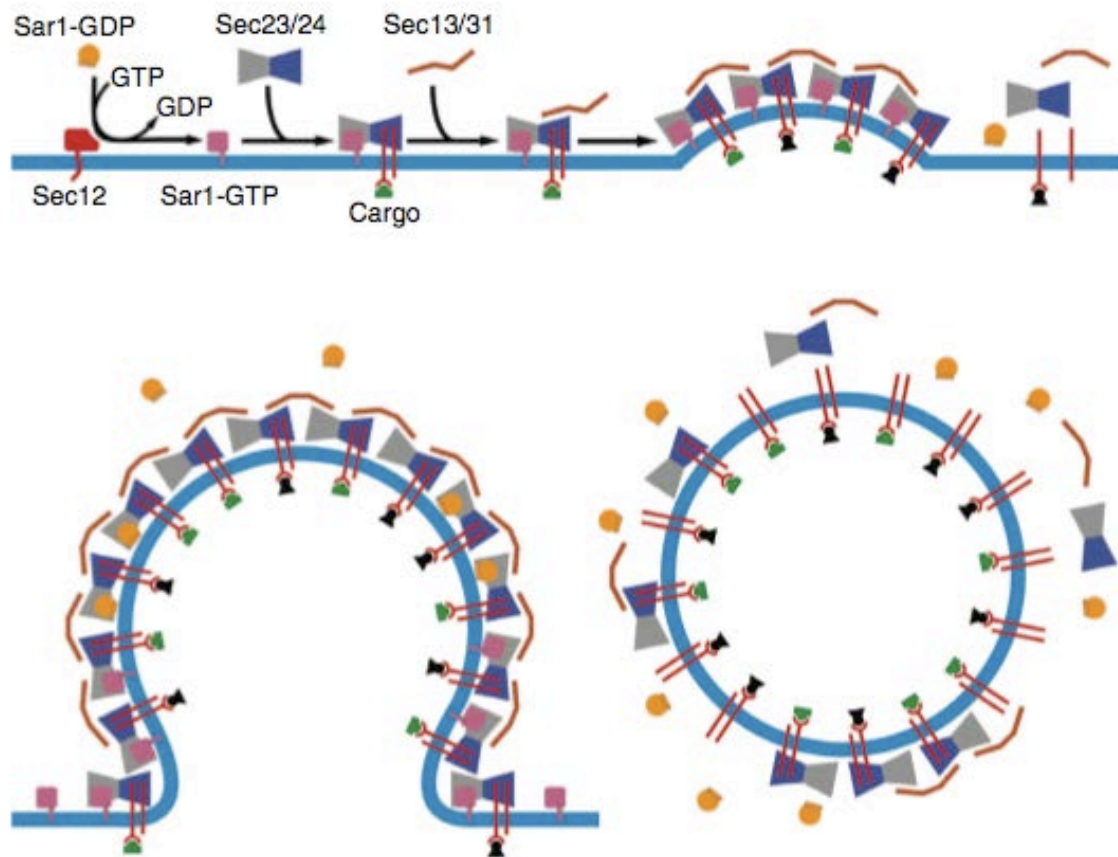
De plus, ces auteurs ont montré l'importance du phénomène d'acidification de la BCV dans le contrôle de son trafic intracellulaire. En effet, il semble que lorsque l'acidification de la BCV est perturbée, comme par exemple lors d'un traitement à la bafilomycine, un inhibiteur de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, le trafic du compartiment et donc la réplication de la bactérie sont perturbés<sup>32</sup>. Au cours du trafic de la BCV, son pH va diminuer pour atteindre un pH minimum de 4 à 5 pH correspondant à celui de la lumière du lysosome<sup>26,32-34</sup>. Cette acidification progressive est nécessaire à l'induction de l'opéron *virB* codant pour les protéines formant un système de sécrétion de type 4 (T4SS) requis pour la fusion de la BCV avec le RE<sup>24,29,35</sup> (Pour plus d'informations sur le T4SS de *Brucella*, voir la Boîte 2). Vu les nouvelles informations apportées par cette étude, il est possible que les fusions transitoires avec les composants tardifs de la voie endosomale contribuent à cette acidification.

Un troisième modèle basé sur l'autophagie a également été proposé par Pizzaro-Cerda et al. en 1998<sup>25</sup>, mais il semble maintenant réfuté. Ce modèle reposait sur des observations en microscopie à fluorescence. En effet, les auteurs avaient mis en évidence une co-localisation rapide de la bactérie (2 h PI) avec un composé autofluorescent, la MDC (MonoDansylCadaverine), une molécule qui s'accumule spécifiquement dans les compartiments autophagiques et acides<sup>25</sup>. Cependant, ces observations n'ont pu être confirmées lors d'une étude ultérieure<sup>24</sup>, ce qui a eu pour conséquence de limiter l'intérêt porté à ce modèle. Une étude réalisée en URPhyM, un laboratoire avec qui nous collaborons, semble confirmer une absence d'implication de l'autophagie dans le processus d'infection par *Brucella* en cellules MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) (E. Goffin, Mémoire 2012).

En conclusion, voici le modèle actuellement accepté pour décrire le trafic intracellulaire de *Brucella*. Une fois internalisée, la bactérie va transiter à l'intérieur de la BCV. Au cours des premières minutes suivant son entrée, la BCV va acquérir différents marqueurs des endosomes précoces tels que Rab5, EEA-1 (*Early Endosome Antigen-1*), ce qui suggère que la BCV interagit avec ces compartiments<sup>24,25</sup>. Ensuite, jusqu'à 6 h PI, la BCV va progressivement perdre les marqueurs d'endosomes précoces et acquérir des marqueurs d'endosomes tardifs tels que LAMP-1, CD63 et Rab7<sup>32</sup>. De nouveau et d'un point de vue dynamique, la BCV va progressivement exclure les marqueurs lysosomaux pour acquérir les marqueurs du RE tels que la calnexine, la calréticuline et Sec61 $\beta$ <sup>24</sup>. A 12 h PI, on observe des composants tardifs de la voie endosomale à proximité de la niche de réplication contenant la bactérie, cependant cette dernière reste négative pour les marqueurs des lysosomes. Cela suggère qu'une fois que la bactérie a atteint sa niche de réplication, la BCV n'est plus fusogénique, ce qui protégerait la bactérie de la dégradation par le lysosome<sup>32</sup>. L'interaction avec les ERES permettant la fusion avec le RE dépend du système de sécrétion de type 4 *virB*, qui sera induit en réponse aux changements environnementaux associés à l'internalisation tels que l'acidification du milieu<sup>34</sup>. Les interactions avec les endosomes tardifs ainsi que le lysosome semblent contribuer à l'acidification dynamique de la BCV et donc à la maturation requise pour atteindre la niche répllicative<sup>32</sup>.

### 1.3.3. Niche de réplication

Comme mentionné au paragraphe précédent, le compartiment contenant les bactéries va s'acidifier et donc permettre l'induction de l'expression de l'opéron *virB*<sup>36</sup> par l'intermédiaire du facteur de transcription IHF (*integration host factor*)<sup>37</sup>. Une fois induit, cet opéron va permettre l'assemblage du T4SS au niveau de l'enveloppe bactérienne. Une fois le T4SS fonctionnel, il va permettre la translocation d'effecteurs nécessaires pour détourner le



**Figure 1.8. Processus de formation des vésicules COPII au niveau des ERES.**

Sec12, une GEF (*guanine exchange factor*) membranaire, est responsable de l'activation de Sar1, une petite GTPase. Cette activation est médiée par le transfert d'un GTP à la place du GDP. Le transfert du GTP va permettre l'insertion de Sar1 en membrane. Une fois en membrane, Sar1 va recruter l'hétérodimère Sec23/24 via une interaction avec Sec23, ce qui va induire la courbure de la membrane. Sec 23 est une GAP (*GTPase activating protein*) qui va stimuler/augmenter l'activité GTPase intrinsèque de Sar1, tandis que Sec24 est une protéine adaptatrice permettant le recrutement de protéines cargo. Ensuite, le complexe Sar-GTP/Sec23/24 pourra recruter l'hétéro-tétramère Sec13/31 pour former la couche la plus externe du manteau. Une fois ce complexe formé, la membrane du RE va s'invaginer et former une vésicule. Le démantèlement du manteau COPII résulte de l'hydrolyse du GTP porté par Sar1 en GDP. Cette réaction est catalysée par l'activité GAP de Sec23 (Mancias and Goldberg, 2005<sup>11</sup>).



trafic de la BCV vers la niche répliquative. Il est commun pour un pathogène de perturber la composition du compartiment le contenant afin de se générer une niche répliquative non fusogénique lui fournissant une protection contre une dégradation par le lysosome<sup>38</sup>. Récemment, une caractérisation protéique de la niche répliquative de *Brucella* a montré la présence de Rab2 et GAPDH, deux protéines impliquées dans le trafic rétrograde entre l'ERGIC (*Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment*) et le RE.<sup>39</sup> Il semble que le trafic existant entre le Golgi et le RE soit bénéfique à l'établissement de la niche de répliquative ainsi qu'à la répliquative de la bactérie. Une hypothèse proposée par les auteurs serait qu'une répliquative intensive nécessite un apport de membrane pour élargir le compartiment<sup>39</sup>. Une étude menée au laboratoire (URBM) suggère que RicA, le premier effecteur de *Brucella* pour lequel une fonction a été proposée, pourrait être impliqué dans le recrutement de Rab2 au niveau de la BCV. En effet, le mutant délété de RicA ne recrute plus Rab2 et présente une cinétique de trafic altérée<sup>40</sup>.

Il a été montré par des études en microscopie à fluorescence que la BCV interagit avec le RE au niveau de sites spécialisés dans l'export de protéines appelés ERES. En effet, la BCV co-localise avec p58, un récepteur cargo situé spécifiquement au niveau des ERES<sup>27</sup>.

Il semble que l'ouverture du RE permettant la fusion de la BCV avec celui-ci soit dépendante de Sar1, une petite GTPase impliquée dans la formation du manteau COPII (*coat protein 2*) (Figure 1.8.). En effet, dans des cellules HeLa qui surexpriment un dominant négatif de cette protéine, on observe une absence de répliquative de la bactérie.<sup>27</sup>

#### **1.4. Adaptations à l'infection chronique**

Une infection par un pathogène intracellulaire va induire de profonds bouleversements de la physiologie de sa cellule hôte. En effet, entre les moyens mis en œuvre par la cellule pour tenter de la détruire et les mécanismes développés par la bactérie pour survivre et se répliquer dans cet environnement hostile, de nombreuses fonctions cellulaires sont affectées. Une étude transcriptomique à haut débit a montré que dans des macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*, à 4 h PI, l'expression de plus de 140 gènes (sur 6600 analysés) était modulée positivement ou négativement<sup>41</sup>, ce qui traduit bien l'ampleur des modifications physiologiques que fait subir *Brucella* à la cellule hôte eucaryote. Parmi ces gènes on retrouve par exemple des gènes associés à l'apoptose, des gènes encodant des cytokines ou encore des gènes associés à la mitochondrie.

Une infection chronique nécessite un état d'équilibre entre les moyens de défense mis en place par l'hôte et les mécanismes développés par la bactérie pour y échapper. Au cours de ce chapitre, nous allons décrire le type de réponse immunitaire développée par les mammifères pour contrôler une infection par un pathogène intracellulaire. Ensuite, nous passerons en revue une série d'adaptations mises en place par *Brucella* pour éviter ces moyens de défense et verrons également en quoi il est important pour la bactérie de modérer sa virulence dans son propre intérêt.

##### **1.4.1. Défenses mises en place par l'hôte contre l'invasion de pathogènes intracellulaires**

La réponse immunitaire développée par un organisme infecté peut être subdivisée en deux catégories : la réponse immunitaire innée, qui est une réponse générique de l'hôte à un pathogène et la réponse immunitaire adaptative, une réponse spécifique développée contre un pathogène rencontré auparavant. Cette classification est plus historique que physiologique puisqu'il est maintenant bien établi que ces deux types de réponses agissent de concert<sup>42,43</sup>.

Le développement d'une réponse immunitaire adaptative prenant environ 5 à 7 jours, la réponse immunitaire innée est donc la première ligne de défense mise en place par l'organisme<sup>44</sup>.





Cette réponse repose sur la reconnaissance de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) par différents PRRs (*pattern recognition receptors*). Il existe des PRRs solubles et d'autres exprimés à la surface des cellules. La reconnaissance d'un PAMP par un PRR soluble va par exemple permettre l'activation de la cascade du complément qui consiste en une activation, en cascade, de différentes protéines sériques retrouvées en réponse à la détection d'un PAMP. Les produits de ces activations vont agir directement en formant des trous dans la membrane plasmique des pathogènes détectés ou, indirectement, en facilitant l'internalisation des pathogènes par les phagocytes professionnels ainsi qu'en recrutant les autres effecteurs du système immunitaire via le processus de chimiotaxie. De plus, les PAMPs peuvent être reconnus par des PRRs portés à la surface de divers leucocytes, les cellules effectrices du système immunitaire inné<sup>45</sup>. L'interaction PAMP-PRR va permettre d'indiquer aux leucocytes les cibles à éliminer. Dans le cadre d'infections bactériennes, les leucocytes impliqués sont principalement les phagocytes professionnels tels que les macrophages, les cellules dendritiques et les polymorphonucléaires, qui vont internaliser les bactéries reconnues afin de tenter de les éliminer. Nous allons maintenant détailler les principaux mécanismes anti-bactériens développés par les macrophages afin de détruire les pathogènes internalisés<sup>46</sup>.

Premièrement, une fois phagocytée, la bactérie va se trouver dans un phagosome qui va s'acidifier grâce à l'activité d'une pompe à protons, la  $H^+$ -ATPase vacuolaire<sup>47</sup>. L'acidification du compartiment va permettre l'activation de protéases acides telles que la cathepsine D<sup>48</sup>.

Deuxièmement, les macrophages activés vont produire des ROS (*reactive oxygen species*) et RNS (*reactive nitrogen species*). En effet, la NADPH oxydase (NOX), localisée au niveau de la membrane du phagosome, va conduire à la production de radicaux anioniques superoxydes dans la lumière du phagosome ( $O_2^-$  et  $H_2O_2$ )<sup>49</sup> ainsi qu'un puissant antibactérien, l'acide hypochloreux (HOCl). De plus, les interférons de type I et II sont capables d'induire l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui est capable de produire de l'oxyde nitrique (NO). Ce NO est capable de diffuser à travers les membranes et donc d'atteindre les pathogènes contenus dans le phagosome<sup>50</sup>. La NOX et l'iNOS peuvent également agir ensemble et produire du peroxyde nitrique  $ONOO^-$  suite à la réaction radicalaire entre  $O_2^-$  et NO. Le peroxyde nitrique possède une forte toxicité par lui-même mais est également une source de radicaux secondaires, eux aussi bactéricides, tels que le  $OH^-$  ou le  $CO_3^{2-}$ <sup>51</sup>.

Enfin, une fois dans le lysosome, la bactérie sera exposée à un arsenal d'enzymes hydrolytiques comprenant des lipases, des protéases ou encore le lysosyme, une muramidase qui est capable de dégrader le peptidoglycan<sup>52</sup>. Ensuite, les produits de dégradation du pathogène peuvent être présentés aux autres PRR et ainsi permettre d'établir un lien avec le système immunitaire adaptatif<sup>53</sup>.

Dans certaines conditions, il semblerait que l'autophagie puisse également être impliquée dans la destruction des pathogènes phagocytés. En effet, la stimulation des voies autophagiques par de l' $IFN\gamma$  va permettre d'outrepasser le blocage de la fusion du phagosome avec le lysosome observé chez les macrophages lors d'une infection par *M. tuberculosis*<sup>54</sup>. De plus, l'autophagie permet d'augmenter la présentation des antigènes des pathogènes dégradés par les MHC (*Major Histocompatibility Complex*)<sup>55</sup>.

Etant donné la localisation intracellulaire de la bactérie, la réponse immunitaire adaptative développée contre *Brucella* est essentiellement de type cellulaire, c'est-à-dire Th1, bien que les anticorps peuvent aussi aider à contrôler l'infection lors de stades précoces<sup>56</sup>.



En effet, les différentes cellules infectées et, plus particulièrement, les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPAP) telles que les cellules dendritiques (CD), vont présenter à leur surface des antigènes de la bactérie au niveau de leur MHC. Ceux-ci seront ensuite reconnus par un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> via une interaction entre le TCR (*T-cell receptor*) et le complexe MHC/peptide présent à la surface de la CPAP. Selon l'antigène présenté, le lymphocyte va se différencier en type Th1 ou en Th2. Dans le cas d'une infection par *Brucella*, la réponse immunitaire est de type Th1<sup>56</sup>.

Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont également appelées lymphocytes « T helper ». En effet, elles n'ont pas d'activité bactéricide proprement dite, mais présentent plutôt la capacité d'orchestrer l'action des différents acteurs de l'immunité adaptative<sup>57</sup>. Lorsqu'il est différencié de manière Th1, le lymphocyte « T helper » va, premièrement, activer les phagocytes afin de les rendre plus aptes à détruire les bactéries (par exemple en favorisant la fusion des phagosomes aux lysosomes ou en induisant leur production de ROS et RNS<sup>46</sup> et deuxièmement, induire la production d'anticorps par les lymphocytes B afin de favoriser l'internalisation des pathogènes de manière spécifique par les phagocytes via le phénomène d'opsonisation<sup>58</sup>. De plus, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th1 sont capables d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, dits cytotoxiques, afin de permettre la destruction de cellules infectées de manière spécifique. En effet, ces lymphocytes, lorsqu'ils reconnaissent un antigène associé au MHC via leur TCR, sont capables d'induire la mort de la cellule portant ce MHC/peptide et ce, par plusieurs mécanismes : 1) en induisant la formation de pores à travers la membrane plasmique et 2) en délivrant du granzyme, une sérine protéase induisant l'apoptose de la cellule<sup>59</sup>.

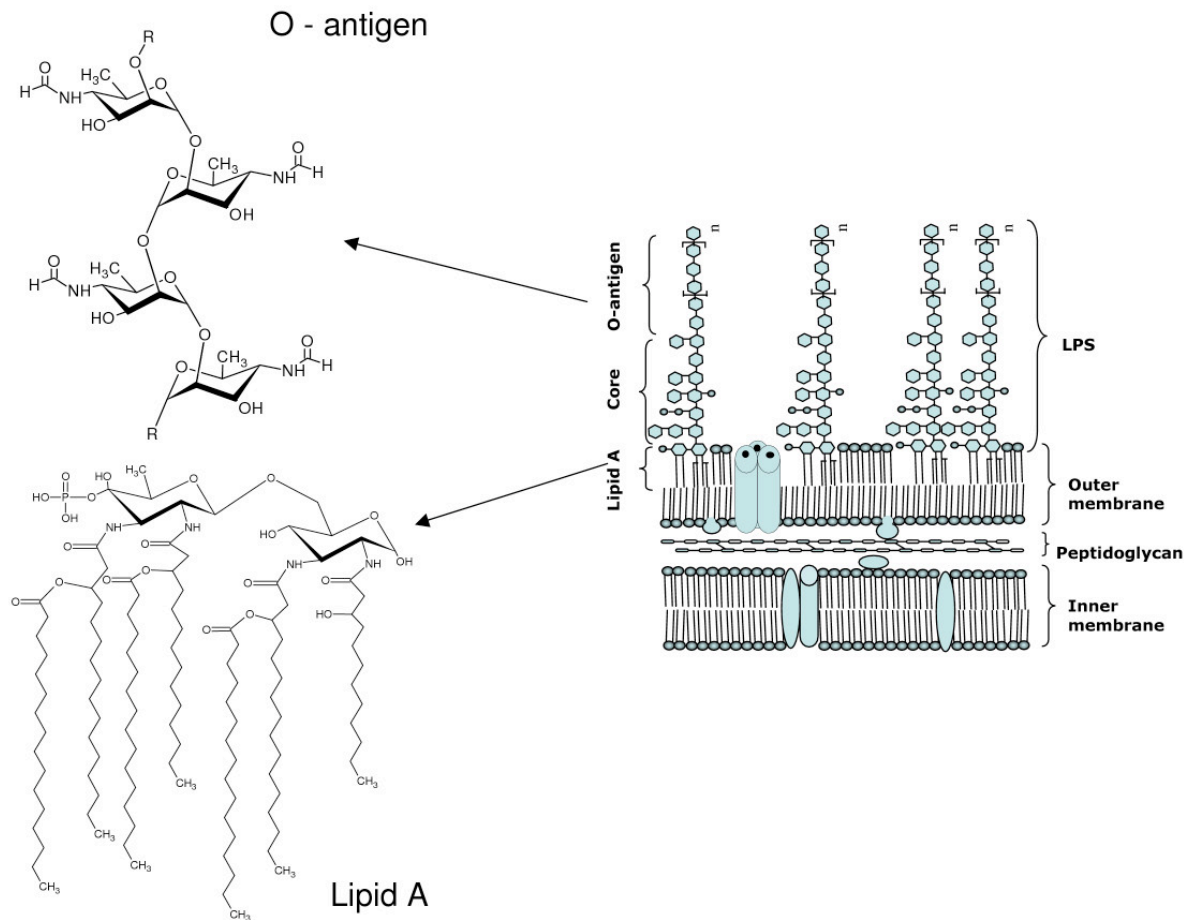
#### **1.4.2. Adaptations de *Brucella***

Dans le cadre d'une infection par *Brucella*, la bactérie est non seulement phagocytée par les moyens décrits ci-dessus mais colonise également, de manière active, les phagocytes. L'infection de telles cellules implique de nombreux risques. En effet, les phagocytes possèdent à leur surface les PRRs nécessaires pour détecter la bactérie mais aussi un arsenal d'agents bactéricides nécessaires à la dégradation de cette dernière. Le tropisme pour ces cellules nécessite donc des adaptations afin de contourner les défenses mises en place par l'hôte.

##### **a. Résistance aux environnements hostiles rencontrés**

Lorsque la bactérie est internalisée, elle doit faire face à de nombreux changements de son environnement. En effet, l'intérieur de la vésicule qui la contient est caractérisé par un pH acide. De même, la quantité de nutriments disponibles pour la bactérie est probablement faible. De plus, les macrophages sont connus pour leurs activités antibactériennes telles que la production de ROS, de RNS et de peptides antimicrobiens décrits au point précédent<sup>60,61</sup>.

Il a été montré que le génome de la bactérie contient des gènes qui codent pour de nombreux acteurs impliqués dans l'adaptation à ces conditions défavorables. A titre d'exemple, citons des gènes codant pour différentes protéines impliquées dans le métabolisme des ROS telles que *SodC*, une superoxyde dismutase qui protège la bactérie de l'explosion respiratoire observée dans les macrophages infectés<sup>62</sup> ou encore, *KatE* et *AhpC*, deux enzymes impliquées dans la détoxification de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré lors du métabolisme de la bactérie<sup>63</sup>. De même, le génome de la bactérie contient un opéron appelé *norEFQBQD*, codant pour une réductase de l'acide nitrique capable de détoxifier les RNS produits par les macrophages infectés<sup>64,65</sup>. Ajoutons encore que *Brucella* produit des protéines qui lui permettent d'adapter son métabolisme lors de l'infection tels que des transporteurs d'hydrates de carbone (sucres), d'acides aminés ou de cations bivalents ainsi que des enzymes centrales dans le métabolisme du carbone<sup>35</sup>.



**Figure 1.9. Structure du LPS de *Brucella*.**

Le LPS de *Brucella* est moins endotoxique que le LPS d'*E. coli*. Cela est dû à la présence d'un lipide A non canonique. En effet, lorsque l'on compare la structure des LPS de ces bactéries, on note quelques différences. Premièrement, les chaînes acyle du lipide A sont plus longues dans le LPS de *Brucella* (C18-C19, C28 versus C12 et C14). De plus le lipide A de *Brucella* possède un squelette constitué de diaminoglucose plutôt que de glucosamine. Enfin, l'ancrage du lipide A au core est différent puisque le lipide A de *Brucella* est ancré par un lien amide plutôt qu'un lien ester (Cardoso et al., 2006<sup>12</sup>).

### **b. Détournement du trafic intracellulaire et établissement d'une niche de réplication protectrice**

Comme détaillé au point 3.2., *Brucella* est capable de détourner le phagosome qui la contient afin de permettre la maturation nécessaire pour atteindre sa niche répliquative, un compartiment dérivé du RE. Celui-ci confère différents avantages à la bactérie. Premièrement, il protège la bactérie de l'immunité innée ainsi que de l'activité bactéricide des macrophages. Deuxièmement, le RE est une source de nutriments nécessaires à la réplication de la bactérie. Enfin, le RE semble être un compartiment adapté à une réplication massive de la bactérie puisqu'il constitue un réservoir de membranes important<sup>32,39</sup>.

### **c. Empêchement de l'initiation de la réponse immunitaire**

Nous avons vu que la réponse immunitaire contre un pathogène est initiée lorsque des PAMPs, patterns moléculaires spécifiques des pathogènes, sont reconnus par les PRRs exprimés par différentes cellules immunitaires de l'hôte. Afin d'éviter ce phénomène, trois stratégies sont développées par *Brucella*. Premièrement, la bactérie possède un nombre très restreint d'appendices extracellulaires puisqu'elle ne possède ni fimbriae, ni pili, ni capsule. Deuxièmement, *Brucella* a évolué de manière à exprimer des composants de surface (LPS<sup>66-69</sup>, lipides formant les membranes externes<sup>70</sup>, lipoprotéines<sup>66</sup>, et flagelle<sup>71</sup>) qui sont peu (pas) reconnus par les PRRs de l'hôte comme étant des PAMPs (Figure 1.9.). Troisièmement, la bactérie possède de la phosphatidylcholine au niveau de sa membrane externe. La présence de ce phospholipide, également présent dans la membrane cellulaire eucaryote, pourrait permettre d'éviter sa reconnaissance par les acteurs de l'immunité<sup>72</sup>.

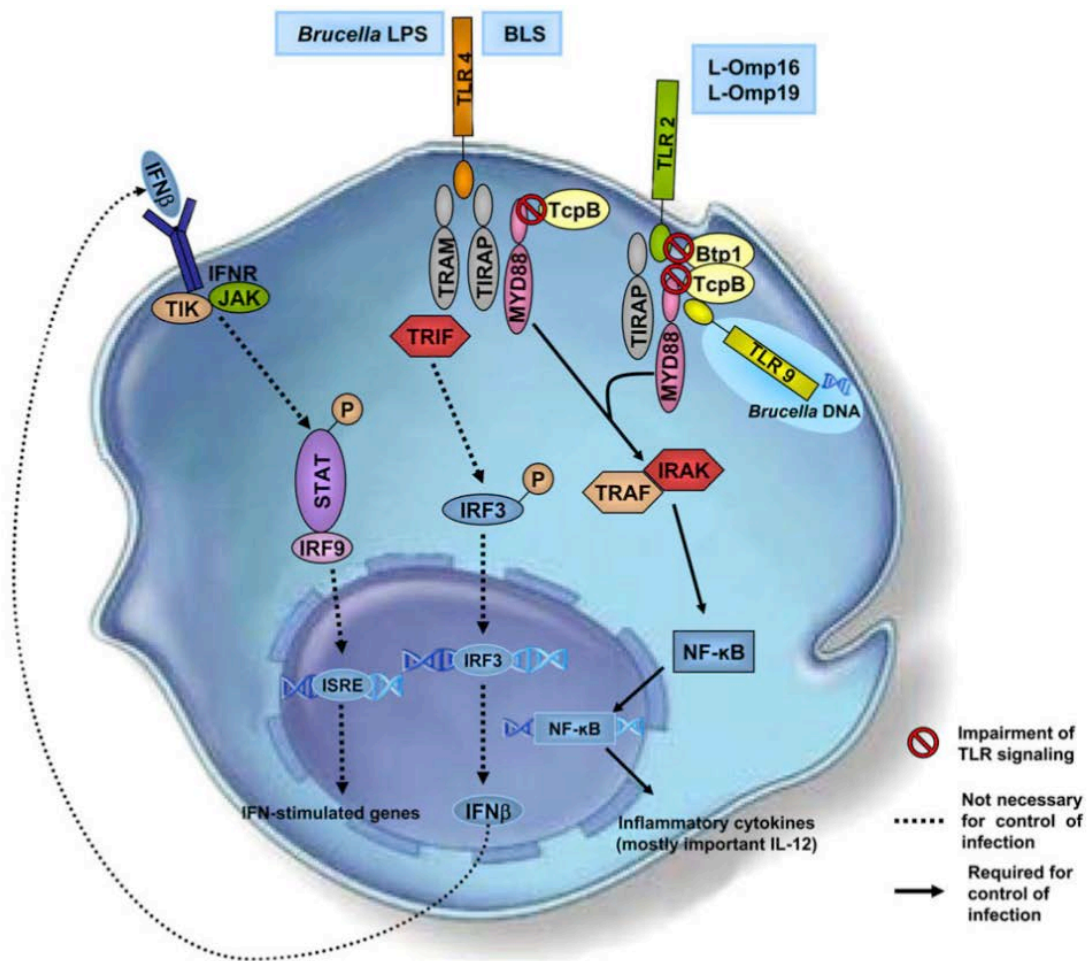
### **d. Interférence avec la réponse immunitaire**

*Brucella* met en œuvre différentes stratégies pour éviter le développement d'une réponse immunitaire adaptative via l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Premièrement, *Brucella* est connue pour se répliquer au sein des cellules dendritiques tant *in vitro*<sup>73,74</sup> qu'*in vivo*<sup>74,75</sup>. Comme mentionné au point 4.1., ces cellules immunitaires ont pour rôle de détecter la présence de pathogènes dans l'hôte et de migrer vers les ganglions lymphatiques afin d'y activer les lymphocytes T spécifiques et ainsi initier une réponse immunitaire adaptative. Il a été montré que *Brucella* est capable d'interférer avec la maturation de ces cellules chez l'homme et chez la souris. En effet, différents traits phénotypiques tels que l'expression du MHCII et des signaux co-stimulateurs CD80 et CD36 ou fonctionnels tels que la sécrétion de cytokines (TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor- $\alpha$* ), IL-12 (*Interleukine-12*)) et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T naïfs, sont sous-régulés par rapport à ceux observés lors d'une infection par d'autres pathogènes comme *S. typhimurium*<sup>74</sup> et *E. coli*<sup>73</sup>.

L'activation des cellules dendritiques dépend des voies de signalisation qui se trouvent en aval des TLR (*Toll-like receptor*), une classe de PRR, exprimés à leur surface. Cette signalisation fait intervenir différentes interactions « protéine-protéine » dont les acteurs comportent un domaine TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*). Il a été montré *in vitro* que *B. abortus* exprime une protéine nommée Btp1 (*Brucella TIR protein 1*) capable d'interférer avec la voie de transduction en aval de TLR2 et ainsi limiter la maturation des cellules dendritiques. Les mécanismes d'action de cette protéine ne sont pas encore clairs<sup>74</sup>.

Deuxièmement, le LPS de *Brucella* étant résistant à la dégradation par les macrophages, celui-ci pourra être présenté par les MHCII mais sous une forme plus longue que les peptides habituellement présentés. Cela va induire l'agrégation des molécules de MHCII au sein de complexes, appelés « macrodomaines », situés au niveau de la membrane plasmique et ainsi limiter la présentation antigénique par les macrophages infectés et ce, probablement en perturbant les voies de signalisation intracellulaires associées à ces complexes<sup>76</sup>. Cependant, il est intéressant de souligner que ces conclusions sont basées sur des injections de LPS de



**Figure 1.10. Voies de signalisation en aval des TLRs activés par *Brucella* dans les macrophages et les cellules dendritiques.**

Les PAMPs de *Brucella* sont reconnus par différents TLRs: le TLR2 (PAMP reconnu : OMP - *outer membrane proteins*), TLR4 (PAMP reconnu : LPS dans les macrophages et BLS (*Brucella lumazine synthase*) dans les cellules dendritiques)), et le TLR9 (PAMP reconnu : ADN). Ces différents TLRs vont initier des voies de signalisation dépendantes d'interactions entre domaines TIR de protéines adaptatrices (MyD88, TRAM et TIRAP) qui vont mener à l'activation des MAPK, de NF-κB et, *in fine*, à l'expression de cytokines pro-inflammatoires (essentiellement IL-12). L'IFNβ est également produit en aval de la voie initiée par le TLR4. Celui-ci se liera au récepteur à l'IFN et induira l'expression de gènes cibles.

*Brucella* synthétise également des protéines capables de lier certaines protéines adaptatrices de la cellule hôte au niveau de leur domaine TIR inhibant ainsi l'activation des voies en aval. Les flèches continues représentent les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'infection *in vivo* tandis que les flèches discontinues soulignent celles qui ne le sont pas (Oliveira et al., 2008<sup>13</sup>).

*Brucella* en intra-péritonéal. En effet, lors d'immuno-marquages réalisés en URBM, des clusters LPS positifs au niveau de la membrane plasmique de cellules infectées lors d'infections classiques n'ont jamais pu être mis en évidence (données non montrées). La relevance physiologique de ce phénomène doit donc encore être démontrée.

#### **e. Détection de *B. abortus* par les TLR**

Comme expliqué au point 4.1 de cette introduction, les PRRs jouent un rôle primordial pour initier la réponse immunitaire. Les PRRs les plus étudiés sont les TLRs. Ces derniers sont des récepteurs possédant un domaine LRR (*leucin-rich repeats*) extracellulaire, un segment transmembranaire et un domaine TIR cytoplasmique. Lors de la reconnaissance d'un PAMP par le récepteur, différentes cascades de signalisation vont être activées par l'intermédiaire d'interactions entre domaines TIR, permettant premièrement une modulation de la transcription de gènes cibles tels que des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et deuxièmement, induire une réponse rapide médiée par l'activation de la cascade des MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) induisant la phagocytose de la particule portant le PAMP<sup>77</sup>. Chez la souris, il existe 12 TLRs différents, spécialisés dans la reconnaissance de PAMPs de nature particulière (lipidique, lipoprotéique, protéique, nucléique)<sup>78</sup>.

Dans le cadre d'une infection par *B. abortus*, il semble que la reconnaissance de la bactérie par les cellules de l'hôte soit médiée par le TLR2, le TLR4 et surtout par le TLR9<sup>79</sup>. Une stimulation de macrophages péritonéaux par des lipoprotéines de *B. abortus* (Omp16 et Omp19 (*outer membrane protein-16 et 19*)) induit la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'activation du TLR2. Cependant, il semble que le TLR2 ne joue aucun rôle dans le contrôle de l'infection *in vivo*<sup>79</sup>. Le LPS non canonique de *Brucella* ne lie que faiblement le TLR4 par rapport au LPS d'*E. coli*<sup>66</sup>. Son implication dans le contrôle de l'infection *in vivo* est donc controversé. Par contre, l'implication du TLR9 semble bien établie. En effet, l'ADN de *Brucella* est capable d'induire la production d'IL-12 via sa liaison au TLR9. Cependant, comme mentionné ci dessus (*d. Interférence avec la réponse immunitaire*), *Brucella* encode des effecteurs à domaine TIR (Btp1 – *B. abortus* et Tcpl – *B. melitensis*) capables d'interagir avec certaines protéines adaptatrices et donc d'interférer avec les voies de signalisation que ces protéines initient (Figure 1.10.).

#### **f. Préservation de l'hôte**

Bien que *Brucella* soit communément caractérisée comme étant une bactérie intracellulaire facultative, cette appellation est uniquement due au fait qu'elle est capable d'être cultivée en milieu de culture artificiel. En effet, *in vivo*, la bactérie est pratiquement exclusivement retrouvée au sein de cellules de son hôte. Il n'existe donc pas de réservoir environnemental de la bactérie<sup>80</sup>. Il est donc primordial pour la bactérie de pouvoir coloniser la cellule hôte, d'y survivre et de s'y répliquer<sup>80</sup>.

Lors d'une infection *in vitro*, et aussi probablement *in vivo*, *Brucella* ne tue pas la cellule hôte<sup>66</sup>. Au contraire, elle va, par exemple, protéger les monocytes humains de l'apoptose<sup>13</sup>. De même, l'infection par *Brucella* ne semble pas perturber les fonctions de la cellule hôte puisque cette dernière est capable d'effectuer des mitoses même à des étapes de l'infection où la charge bactérienne est élevée<sup>81</sup>. Résider à l'intérieur de macrophages confère donc à la bactérie deux avantages majeurs : premièrement, elle se trouve à l'abri des effecteurs du système immunitaire et deuxièmement, il semblerait que les macrophages pourraient servir de véhicule pour assurer la dissémination de la bactérie au sein de l'organisme infecté<sup>75</sup>.

Nous venons de montrer que la niche répliquative de *Brucella* est un compartiment dérivé du RE. Il est donc pertinent de se questionner sur l'effet qu'a la bactérie sur l'organite. En effet, il paraît plausible qu'une répllication bactérienne soutenue puisse perturber la physiologie et les fonctions du RE. Nous allons donc, dans le chapitre suivant, développer les mécanismes





moléculaires qui régissent la réponse UPR (*unfolded protein response*), une réponse développée en réponse à un stress du RE, ainsi que les liens établis entre l'UPR et les infections par différents pathogènes intracellulaires.

## II. Le réticulum endoplasmique

### 2.1. Structure et fonction dans la cellule eucaryote

Le réticulum endoplasmique est un organe constitué d'un réseau membranaire observé pour la première fois en 1945 par Porter et collaborateurs<sup>82</sup>. On peut distinguer le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et le réticulum endoplasmique lisse (REL). Ces deux domaines de l'organe ont des fonctions différentes. En effet, le RER est le premier organe du système de sécrétion des cellules eucaryotes. En continuité avec l'enveloppe nucléaire externe, il porte de nombreux ribosomes à sa surface, d'où l'appellation de RE rugueux. Il est impliqué dans la synthèse et la maturation des protéines. Le REL, quant à lui, contient des enzymes impliquées dans des fonctions, relativement spécifiques du type cellulaire considéré, comme par exemple : des enzymes de détoxification de drogues au niveau des hépatocytes, des enzymes impliquées dans la régulation de la concentration en calcium dans les cellules musculaires, ou encore dans la synthèse des lipides et des stéroïdes dans les cellules endocriniennes. Le stress du réticulum que nous allons développer dans ce chapitre est associé au RER et portera exclusivement sur la réponse UPR activée par l'accumulation de protéines mal conformées.

Dans les cellules eucaryotes, les protéines sécrétées ainsi que celles localisées en sein des différentes membranes transitent par le RE. Les ribosomes vont se fixer au niveau du RER et introduire le polypeptide en élongation via le translocon<sup>83</sup>. Une fois à l'intérieur, la protéine va acquérir sa conformation et être maturée. En effet, l'environnement oxydant de la lumière du RER est favorable à la formation de ponts disulfure. De plus la présence de nombreuses chaperonnes et d'enzymes capables d'assurer des modifications post-traductionnelles des protéines va favoriser leur repliement<sup>84,85</sup>. Enfin, le RER possède un système de contrôle de qualité qui vérifie que les protéines ont acquis la conformation adéquate pour quitter l'organe<sup>86</sup>.

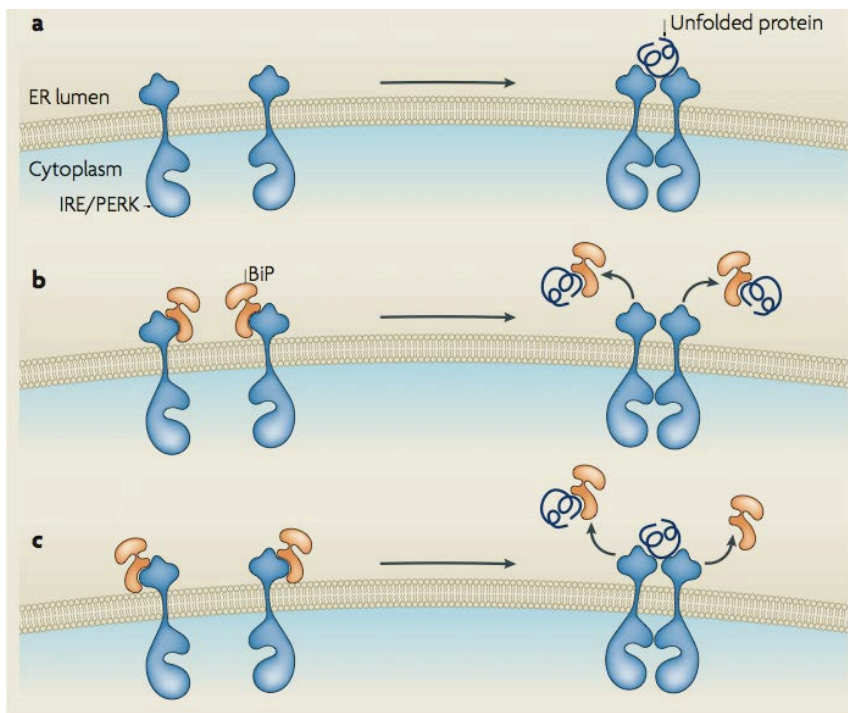
La charge protéique de l'organe dépend beaucoup du type cellulaire et de l'état physiologique de la cellule. Il existe donc des senseurs capables de déterminer l'état de surcharge du RE et de le communiquer au reste de la cellule afin de maintenir l'homéostasie de l'organe<sup>87</sup>. La réponse développée en cas d'accumulation de protéines mal conformées dans le RER s'appelle l'UPR qui va ainsi tenter d'initier, dans un premier temps, une réponse adaptative<sup>87</sup>. Nous allons maintenant détailler les effecteurs moléculaires de cette réponse.

### 2.2. L'UPR

#### 2.2.1. Détection d'un stress du RE

La réponse UPR est initiée lorsque la concentration des protéines mal repliées dans la lumière du RE augmente. Actuellement, trois senseurs de ce phénomène ont été identifiés. Il s'agit d'IRE1 (*inositol requiring protein 1*), d'ATF6 (*activating transcription factor 6*) et de PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*), tous trois localisés au niveau de la membrane du RE. Ces trois protéines possèdent un domaine senseur situé dans la lumière du RER. A l'état basal, ces domaines interagissent avec BiP (*immunoglobulin binding protein*) (encore appelée Grp78 : *Glucose-regulated protein* of 78 kDa), une chaperonne du RE, ce qui a pour effet d'inhiber l'activité des enzymes senseurs (voir point 2.2.). Lorsque la quantité de protéines mal repliées augmente, BiP sera recrutée afin d'aider à leur repliement, ce qui va limiter sa disponibilité pour interagir avec les senseurs et donc permettre leur activation<sup>87</sup>. De



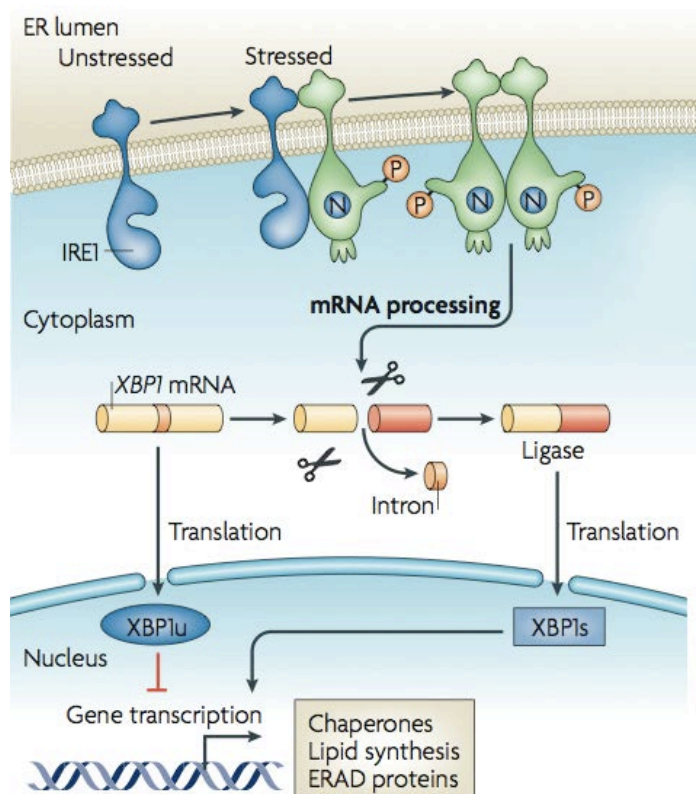


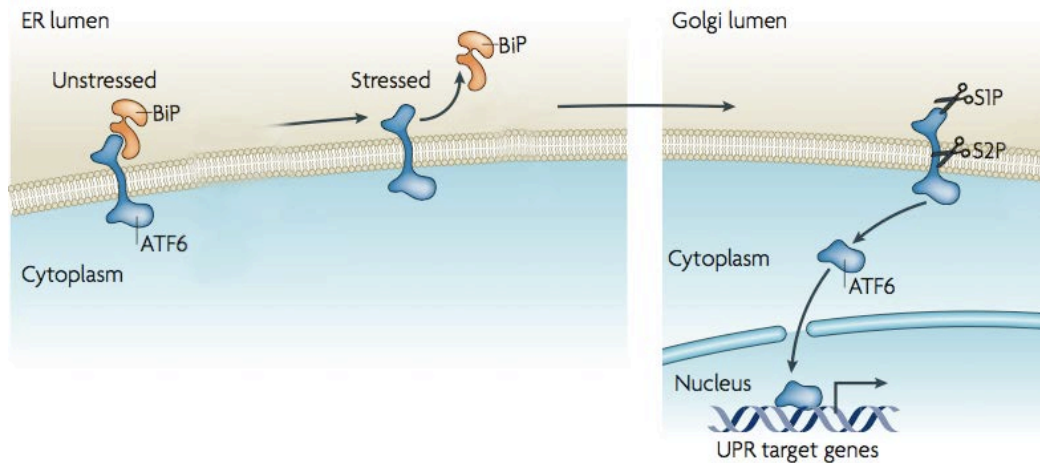
**Figure 1.11. Mécanismes de détection d'un stress du RE.**

Il existe deux modes d'activation des senseurs de l'UPR. Premièrement, les domaines senseurs de PERK et ATF6 sont capables d'interagir avec les polypeptides non repliés (a). De plus, les domaines senseurs des protéines ATF6, PERK et IRE sont capables d'interagir avec BiP (Grp78), une chaperonne du RE (b). Un troisième modèle propose une combinaison des deux mécanismes pour IRE1 et PERK (c) (Ron et Walter, 2007<sup>14</sup>).

**Figure 1.12. Voies de signalisation en aval de l'activation d'IRE1.**

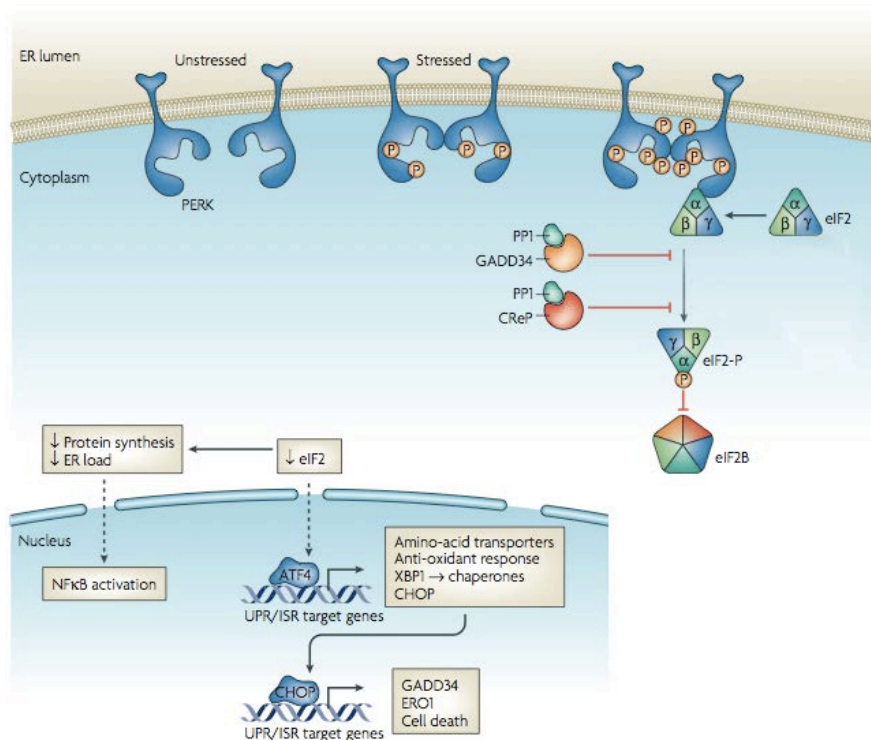
IRE1 est une protéine transmembranaire du RE. Celle-ci est constituée d'un domaine senseur situé dans la lumière de l'organite, d'un segment transmembranaire et d'un domaine cytosolique doté d'une activité kinase et endoribonucléase<sup>15,16</sup>. Lorsqu'un stress du RE est perçu par le domaine senseur, IRE1 va oligomériser et ainsi permettre l'auto-transphosphorylation des domaines kinases juxtaposés. IRE1 est une kinase particulière, puisque la seule cible de phosphorylation actuellement connue est la kinase elle-même<sup>17</sup>. La phosphorylation du domaine kinase va induire, par un mécanisme encore peu compris, le clivage spécifique de l'ARNm de XBP1 (*X binding protein 1*)<sup>18,19</sup>. Celui-ci sera ensuite ligué par la Trl (*tRNA ligase*). L'épissage non conventionnel de l'ARNm (XBP1s - *spliced*) va induire un décalage dans le cadre de lecture et ainsi mener à la traduction d'une protéine très différente de celle codée par l'ARNm non épissé (XBP1u - *unspliced*). En effet, la protéine codée par XBP1s est un activateur de la transcription de gènes cibles de l'UPR, alors que celle codée par XBP1u réprime la transcription de ces mêmes gènes<sup>19</sup> (Figure 11). Parmi les gènes cibles de la réponse UPR, citons par exemple ERdj4, une chaperonne du RE<sup>20,21</sup>, EDEM (*ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein*), une protéine impliquée dans le système ERAD (*endoplasmic reticulum-associated protein degradation*)<sup>21,22</sup> ou encore PDI-P5 (*protein disulfide isomerase P5*)<sup>21</sup>. De plus, XBP1 est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse de lipides permettant une augmentation de la capacité du RE<sup>23</sup> (Modifié de Ron et Walter, 2007<sup>14</sup>).





**Figure 1.13. Signalisation en aval de l'activation d'ATF6.**

ATF6 est une protéine présente sous la forme d'un précurseur inactif situé dans la membrane du RE. En conditions de stress de l'organite, le précurseur d'ATF6 sera transporté dans l'appareil de Golgi où il sera maturé par des enzymes résidentes de l'organite. En effet, dans cet organite, la protéine subira un premier clivage par S1P au niveau de son domaine intra-luminal, suivi d'un second clivage par S2P au niveau du domaine transmembranaire. Ces deux clivages successifs vont permettre la libération du fragment cytosolique possédant une activité de liaison à l'ADN. Une fois libre, ce facteur de transcription transloquera dans le noyau et induira l'expression de ses gènes cibles<sup>24</sup>. Parmi les gènes cibles d'ATF6 on retrouve des gènes codant des chaperonnes telles que BiP et GRP94 (*glucose-regulated protein 94*) et des PDI (*protein disulfide isomerase*)<sup>25</sup>. Le processus de maturation d'ATF6 est comparable à celui des protéines SREBPs (*sterol response element binding proteins*) observé lors d'une déplétion en cholestérol<sup>26</sup> (Modifié de Ron et Walter, 2007<sup>14</sup>).

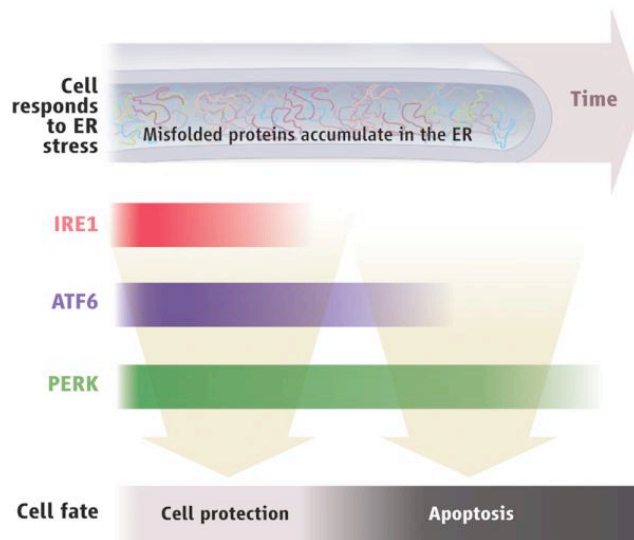


**Figure 1.14. Voies de signalisation en aval de l'activation de PERK.**

PERK possède une structure comparable à celle d'IRE1, c'est-à-dire un domaine senseur situé dans la lumière du RE, un domaine transmembranaire et un domaine kinase cytosolique. PERK, une fois activée assurera la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2α sur la Ser51<sup>27</sup>. La phosphorylation de ce facteur a deux effets. Premièrement, la protéine eIF2α phosphorylée rend le facteur d'échange eIF2B inactif, empêchant donc le remplacement du GDP situé au niveau du facteur d'initiation de la traduction eIF2 par du GTP, ce qui provoque une diminution de l'initiation de l'ensemble de la traduction et donc une diminution globale de la synthèse protéique<sup>28</sup>. Deuxièmement, elle va permettre l'induction de la traduction d'une protéine particulière: ATF4 (Figure 13). En effet, en condition normale, l'ARNm de cette protéine n'est pas traduit car il possède une séquence inhibitrice au niveau de la séquence 5' UTR. Lorsque la protéine eIF2α est phosphorylée, le ribosome va réaliser un bond, ce qui va permettre de passer cette séquence inhibitrice et donc d'entamer la traduction de l'ORF principale<sup>29,30</sup>.

ATF4 est un facteur de transcription qui va, entre autres, activer la transcription de *Ddit3*, le gène codant pour CHOP10 (*C/EBP homologous protein*), un facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes menant à l'apoptose<sup>14</sup>.

L'état d'activation de PERK est très dynamique. En effet, seulement quelques minutes après le retour de l'homéostasie du RE, la protéine PERK est déphosphorylée. Les phosphatases impliquées dans ce processus sont encore inconnues<sup>31,32</sup>. Cependant, pour permettre cette adaptation rapide et mettre fin à l'activation de la voie de signalisation, il est nécessaire que l'état de phosphorylation de eIF2α soit également contrôlé. A ce jour, deux phosphatases, GADD34 (*Growth arrest DNA damage*) et CReP (*constitutive repressor of eIF2α phosphorylation*) ont été identifiées comme des régulateurs négatifs de la phosphorylation d'eIF2α<sup>32-34</sup>. *ppp1R15b*, le gène encodant CReP est constitutivement exprimé. Ceci mène à un niveau de déphosphorylation basal d'eIF2α<sup>32</sup>, tandis que l'expression de *ppp1R15a* est placée sous le contrôle du facteur ATF4, le facteur de transcription activé en aval de eIF2α-P. La déphosphorylation de eIF2α par GADD34 constitue donc une boucle de rétroaction négative<sup>35,36</sup> (Modifié de Ron et Walter, 2007<sup>14</sup>).



**Figure 1.15. Deux destinées de l'UPR**

Bien que les différentes voies de signalisation de l'UPR soient initiées par un signal, l'existence de trois voies parallèles permet à la cellule de s'orienter vers l'une ou l'autre des branches de la réponse UPR. En effet, la cinétique d'activation des trois est différente, ce qui conduit à l'activation d'un ensemble d'effecteurs particuliers en fonction de la durée et de l'intensité du stress. Selon les effecteurs présents et activés, la cellule s'engagera dans une réponse adaptative protectrice ou dans une voie de mort cellulaire programmée comme l'apoptose (Lin et al, 2007<sup>37</sup>).

plus, il a été montré par des études de cristallographie que les protéines IRE1 et PERK, qui sont actives sous forme de dimères, possèdent un sillon permettant la liaison d'un polypeptide<sup>88</sup>. Il semble en fait que la liaison du polypeptide induise la formation d'homodimères et donc l'activation de ces protéines<sup>87,89</sup> (Figure 1.11.). Les trois senseurs ont des propriétés distinctes et permettent l'activation contrôlée d'une combinaison d'effecteurs différents en fonction de la durée et de l'intensité du stress du RE et donc une réponse contenant plusieurs axes/voies<sup>90</sup>.

### 2.2.2. Voies de signalisation

L'activation des senseurs cités ci-dessus, IRE1, ATF6 et PERK, initie des voies de signalisation distinctes qui vont mener à l'activation de divers effecteurs. Celles-ci sont développées aux Figures 1.12., 1.13. et 1.14.

Si les trois voies sont initiées par des senseurs distincts et initient des voies de signalisation parallèles (avec souvent des cinétiques différentes), des redondances et « cross-talks » entre certaines voies ont été mises en évidence. En effet, il a été montré chez *C. elegans* que des mutations dans les effecteurs de la voie IRE1 ou la voie initiée par ATF6 sont plutôt bien tolérées, alors que la double mutation semble bloquer le développement du ver<sup>91</sup>. De même, environ 50 % des gènes dont la transcription dépend de PERK sont indépendants du contrôle par ATF4<sup>92</sup>. De plus, différentes boucles de rétroaction positives d'un produit d'une voie sur une autre ont pu être identifiées, comme par exemple le fait que XBP1 soit capable d'induire la transcription d'ATF6 ainsi que la signalisation en aval de PERK<sup>93</sup>.

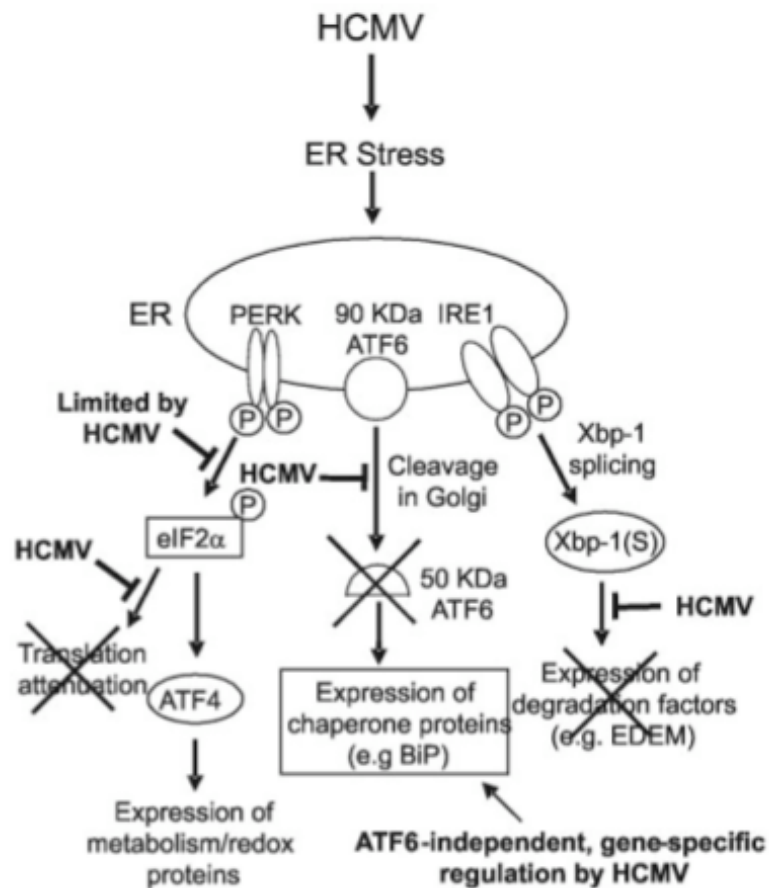
### 2.2.3. Les deux destinées de l'UPR

Le but premier de la réponse UPR est d'assurer l'homéostasie du RE. Elle permettrait d'adapter la capacité du RE aux demandes physiologiques rencontrées par la cellule. Les premiers gènes transcrits seront des gènes tentant de résoudre cette surcharge en protéines mal repliées comme par exemple des gènes codant pour des chaperonnes<sup>94</sup> pour aider à leur repliement, des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides pour augmenter la synthèse de la membrane et la capacité de stockage du réticulum<sup>95</sup> et les gènes codant pour des protéines des complexes ERAD (*endoplasmic reticulum - associated protein degradation*) permettant la rétro-translocation des protéines mal repliées dans le cytosol<sup>96</sup>. Ensuite, l'inhibition de la traduction va permettre de limiter la quantité de protéines présentes dans le RE. De plus, la réinitialisation de la traduction permet d'augmenter la proportion de sous-unités ribosomiques libres présentes dans le cytosol afin de favoriser la traduction des transcrits de gènes induits par les autres voies de l'UPR<sup>97</sup> au détriment des ARNm codant pour des protéines sécrétées nécessitant un passage par le RE<sup>98</sup>.

Cependant, si malgré l'activation de ces voies de signalisation, l'UPR se prolonge (ou si l'intensité du stress est trop importante que pour permettre une réponse adaptative), la cellule va finir par entrer en apoptose.

L'existence de 3 voies parallèles initiées par le même signal peut paraître redondante. Cependant, l'existence de ces 3 voies permet à la cellule de choisir plutôt un destin cellulaire ou un autre. En effet, la cinétique d'activation des différentes voies est différente : la signalisation en aval de IRE va être inhibée rapidement (environs 8 h après l'initiation de la réponse et ce, même si l'origine du stress persiste), ensuite ce sera le tour de la voie dépendante d'ATF6. Par contre, la voie en aval de PERK reste activée à plus long terme (jusqu'à 30 h après l'initiation de la réponse UPR). En fonction des voies activées à un moment donné, un ensemble d'effecteurs différents sera activé et le destin de l'UPR sera donc de promouvoir l'adaptation du RE (et donc de la cellule au stress) ou d'induire la mort cellulaire<sup>90</sup> (Figure 1.15.). Par exemple, une protéine telle que CHOP10 (*C/EBP homologous protein*) codée par le gène *Ddit3* (*DNA damage inducible transcript*), principalement régulé par la voie en aval d'ATF4, est essentiellement connue pour ses propriétés pro-apoptotiques.





**Figure 1.16. Modulation de l'activation des voies de l'UPR lors d'une infection de fibroblastes par le cytomégalovirus humain (CMVH).**

Le CMVH induit l'UPR et inhibe les voies qui induisent des effecteurs qui seraient délétères à sa réplication (ex : atténuation de la traduction, expression des systèmes de dégradation des protéines) et favorise les voies qui induisent l'expression de facteurs bénéfiques à la réplication virale (ex : chaperonnes) (Isler et al, 2005<sup>38</sup>).

En effet, à des temps courts, la quantité de protéines présente est très faible pour induire l'apoptose, mais l'induction de l'expression du gène *Ddit3* en réponse à un stress prolongé du RE est compatible avec l'induction du programme de mort cellulaire programmée<sup>99</sup>. De plus, aux temps précoces, l'ensemble des voies de signalisation est activé, et les facteurs favorisant la survie cellulaire qui sont induits par les autres voies s'opposent à l'effet de CHOP10, ce qui mène à une réponse adaptative. Par contre, aux temps plus tardifs, ATF4 étant le seul facteur de transcription restant actif, l'effet pro-apoptotique de CHOP10 peut mener à une mort cellulaire programmée<sup>90</sup>. Ce facteur de transcription étant activé dans des macrophages 264.7 exposés à *B. abortus* (Nicolas Lebailly, Mémoire 2011), nous détaillerons certains points de la biologie de ce facteur au point III, après avoir développé les relations qui existent entre l'infection par des pathogènes intracellulaires (bactériens et viraux) et la réponse UPR.

## 2.3. UPR et infection

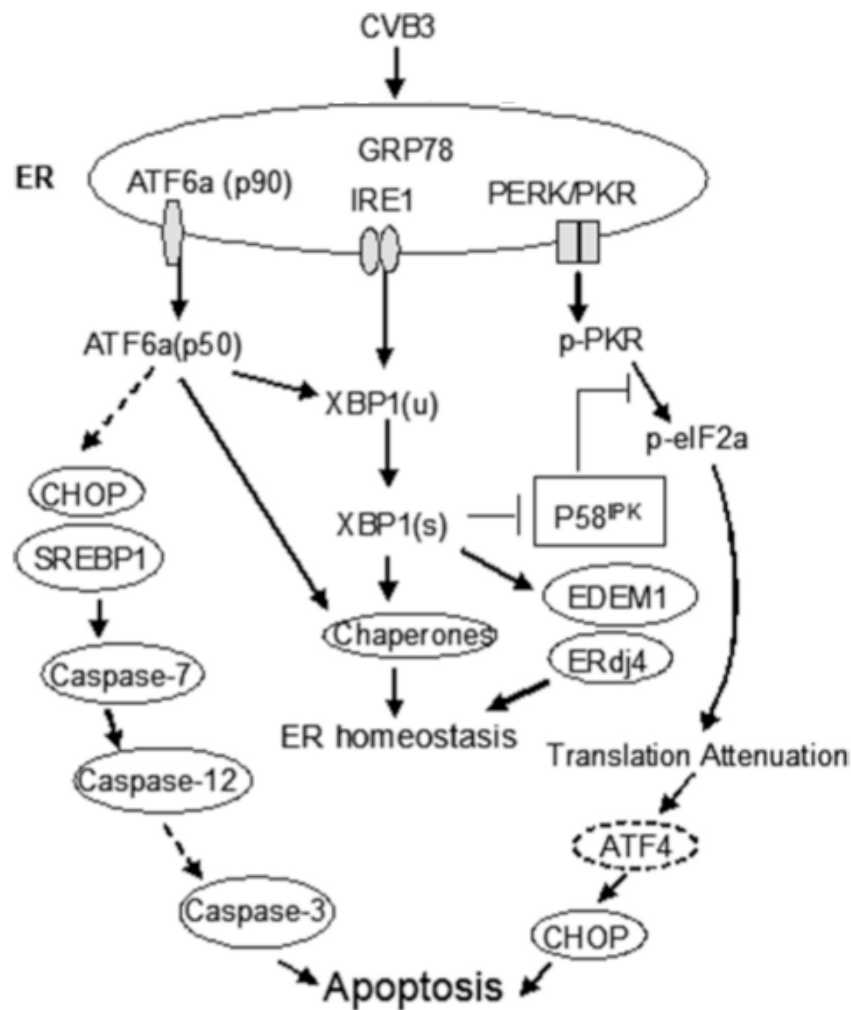
Les pathogènes intracellulaires tant viraux que bactériens vont induire de profonds bouleversements dans la physiologie de la cellule qu'ils infectent. En effet, divers pathogènes sont connus pour induire et/ou moduler l'UPR dans leur cellules hôtes.

### 2.3.1. Pathogènes viraux

De nombreux virus sont connus pour induire une réponse UPR, comme par exemple le HCV (*Hepatitis C virus*), le virus de l'encéphalite japonaise, ou encore le virus responsable de la diarrhée virale bovine<sup>100-102</sup>. Parmi ces virus, nous pouvons tenter de distinguer deux catégories. Il y a des virus qui, comme le CMVH (*cytomégalo virus humain*), induisent l'UPR à cause de la surproduction de protéines qu'ils induisent et qui vont favoriser les voies menant à l'adaptation de la cellule à la surcharge du RE. Deuxièmement, il existe des virus pour lesquels l'induction active de l'UPR est impliquée dans leur virulence, par exemple, parce que les voies pro-apoptotiques en aval de l'UPR vont favoriser leur dissémination. Nous développerons ci-dessous l'exemple de la réponse UPR en réponse à une infection par le CMVH et le CVB3 (*coksackievirus B3*).

#### a. Le cytomégalo virus humain

Le CMVH est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des Herpesviridae. Ce virus, pour se répliquer, doit produire plus de 200 protéines en grande quantité dont beaucoup sont glycosylées et transitent donc par le RE.<sup>103</sup> Il n'est donc pas étonnant que la réplication virale induise un stress du RE. En réponse à ce stress, la cellule va induire la réponse UPR. Parmi les différentes réponses induites, certaines sont bénéfiques pour le virus telles que l'induction de chaperonnes ou l'augmentation de la capacité de l'organite. Cependant, d'autres conséquences de l'UPR sont délétères pour la réplication virale comme par exemple l'atténuation de la traduction ou encore le système ERAD qui va permettre une dégradation des protéines excédentaires dans le RE<sup>104</sup>. Il a été montré que le CMVH est capable d'activer les voies de l'UPR bénéfiques à sa réplication tout en prévenant les conséquences néfastes de celle-ci<sup>104</sup> (Figure 1.16.). Par exemple, lors d'une infection de fibroblastes HEFs (*Life-extended human embryonic foreskin fibroblasts*), la réponse UPR est activée entre 2 et 3 jours PI, moment correspondant à la production massive des glycoprotéines virales tardives. On observe alors une activation de PERK ainsi que la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  (*eucaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$* ) (de manière modérée) qui, normalement, inhibe l'initiation de la traduction et permet la traduction spécifique de l'ARNm d'ATF4. Cependant, en conditions d'infection par le CMVH, on n'observe pas d'atténuation de la traduction<sup>104</sup>. De même, bien que le stress du RE soit perçu par ATF6 (modifications de sa glycosylation), l'infection par le CMVH empêche son clivage protéolytique et donc sa transformation en facteur de transcription actif. Enfin, la voie en aval de IRE est activée lors de l'infection puisque l'on détecte la forme épissée de l'ARNm



**Figure 1.17. Modulation de l'activation des voies de l'UPR lors d'une infection de cellules HeLa par le coxsackievirus B3 (CVB3).**

Le CVB3 induit les 3 branches de l'UPR. Le virus module l'ensemble de ces voies pour orienter l'UPR vers l'apoptose. Les flèches en pointillés indiquent les étapes pour lesquelles les mécanismes sont encore inconnus (Zhang et al, 2010<sup>39</sup>).

d'XBP1. Ce facteur de transcription est connu pour induire l'expression de gènes impliqués dans le système ERAD tels que EDEM1. Cependant, ce gène cible n'est pas induit, suggérant que le virus inhibe l'activité transactivatrice de ce facteur de transcription. L'*herpes simplex virus 1* encode un homologue de GADD34, ICP34,5 (*infected cell protein 34.5*). Il semble donc que ce facteur soit important dans la biologie des herpes virus<sup>105</sup>. Il se pourrait que ce facteur soit impliqué dans la régulation de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans le cadre de l'infection par CMVH, limitant ainsi le taux de phosphorylation du facteur d'initiation. Le CMVH est également capable d'induire spécifiquement la transcription de gènes cibles de l'UPR de manière indépendante de la réponse UPR. En effet, comme mentionné ci-dessus, la voie en aval d'ATF6 n'est pas activée puisque ce facteur n'est pas clivé en conditions d'infection. Cependant, certains gènes cibles d'ATF6, bénéfiques pour la réplication virale, tels que GRP98 et BiP, sont induits en réponse à l'infection, avant même que l'UPR soit initiée. Cette cinétique d'activation correspond à celle de l'expression des gènes viraux précoces et précoces immédiats<sup>104</sup>.

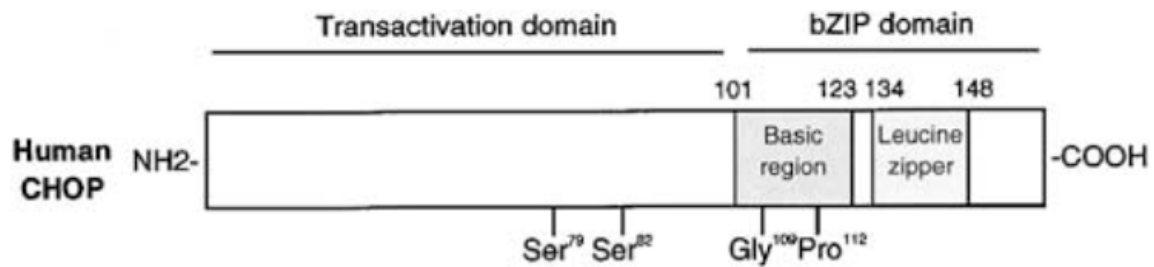
### **b. Le coxsackievirus B3**

Le coxsackievirus B3 (CVB3) est un virus à ARN simple brin de polarité positive, appartenant à la famille des *picornaviridae*. Ces virus sont responsables des myocardites virales. Une étude publiée en 2010 a montré que l'infection de cellules HeLa par ce virus induit un stress du RE ainsi qu'une régulation différentielle des trois voies de signalisation<sup>106</sup> (Figure 1.17.). Premièrement, il semble que la voie dépendant d'ATF6 soit activée dans ces conditions puisque le fragment cytosolique d'ATF6 est détecté dans les cellules infectées. Deuxièmement, il semble que la voie dépendante d'IRE1 soit également activée en réponse à l'infection. En effet, dans les cellules infectées, XBP1 est clivé et est responsable de la modulation de la transcription de différents gènes : une induction de la transcription de EDEM1 (*ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like 1*) et ERdj4 ainsi qu'une inhibition de la transcription de p58<sup>IPK</sup><sup>106</sup>. P58<sup>IPK</sup> est régulateur négatif de la phosphorylation de PERK. La diminution de l'abondance de ce régulateur en réponse à l'infection par CVB3 se traduit donc par une augmentation de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ . Dans ces conditions, la traduction des ARNm coiffés de l'hôte va être inhibée. Par contre, la traduction des ARNm viraux, possédant des sites internes d'entrée du ribosome<sup>107</sup> sera poursuivie. Elle serait même augmentée vu la plus grande disponibilité des ribosomes pour ces transcrits<sup>106</sup>.

Comme mentionné précédemment, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  induit la traduction spécifique de l'ARNm encodant ATF4 qui, à son tour, induira la transcription du facteur pro-apoptotique CHOP10. Cependant, dans les cellules HeLa infectées par CVB3, on n'observe pas d'accumulation protéique d'ATF4 alors que CHOP10 est bien exprimé. Les auteurs suggèrent que dans ces conditions, ATF6, et non pas ATF4, est responsable de l'induction de CHOP10. De plus, il a été montré que SREBP1 est également mûr dans les cellules infectées par CVB3. Il semble donc que SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) et CHOP10 agissent de concert pour induire l'apoptose qui favoriserait la propagation des virus d'une cellule à l'autre<sup>106</sup>.

### **2.3.2. Les pathogènes bactériens**

*M. tuberculosis* est connue pour induire l'apoptose des cellules qu'elle infecte<sup>108</sup>. ESAT-6 (6 kDa *early secretory antigen target*) est un effecteur sécrété dans les macrophages au tout début de l'infection<sup>109</sup>. Une étude publiée en 2010 a montré que cet effecteur induit l'apoptose par un mécanisme dépendant de l'UPR<sup>110</sup>. En effet, il semble que ESAT-6 induise l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP10 par la voie PERK/ATF4/CHOP10 puisque la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'abondance protéique d'ATF4 sont augmentées dans les cellules épithéliales A549 incubées avec l'antigène ESAT-6 recombinant de *M. tuberculosis*.



**Figure 1.18. Structure du facteur de transcription CHOP10**

Les C/EBPs comprennent 2 domaines : un domaine transactivateur amino-terminal et un (*basic loop helix*) domaine carboxy-terminal formé d'un domaine riche en acides aminés basiques impliqué dans la liaison à l'ADN suivi d'un « leucine zipper » permettant la dimérisation du facteur. CHOP possède deux particularités par rapport aux autres C/EBPs. Premièrement, il possède deux résidus serine au niveau du domaine de transactivation qui doivent être phosphorylés par la kinase p38 pour que le facteur devienne pleinement actif. Deuxièmement, il y a deux substitutions au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Celles-ci empêchent la liaison de CHOP au niveau de la séquence consensus reconnue par les autres C/EBPs<sup>40</sup> (Oyadomari and Mori, 2004<sup>40</sup>).

Ce facteur est capable de former des pores à travers les membranes<sup>111</sup>. Ces pores vont perturber la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans la lumière du RE et donc induire un stress UPR. L'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytosol qui s'en suit va induire un stress oxydatif qui lui aussi contribuera à l'induction de l'apoptose<sup>112</sup>.

### 2.3.3. IRE1 et la réplication de *Brucella*

Une étude parue en 2008 a mis en évidence l'implication de différentes protéines connues du RE dans la réplication de *B. abortus*<sup>113</sup>. Les auteurs ont réalisé un criblage par ARN interférant. Sur les 110 gènes codant pour des protéines associées à la biologie du RE qu'ils ont invalidés, 52 protéines modulaient positivement ou négativement le taux d'infection<sup>113</sup>. Parmi ces 52 protéines, 15, dont Cdc42, Sec21 et Rab1, avaient déjà été rapportées comme étant nécessaires à la réplication d'autres pathogènes intracellulaires tels que *Mycobacteria*, *Listeria*, *Legionella* et *Chlamydia*<sup>114-118</sup>.

De même, certains facteurs nécessaires à la réplication de *Brucella* semblent spécifiques de ce genre bactérien. Parmi ceux-ci, IRE1 a retenu l'attention des auteurs. Bien que l'internalisation de *Brucella* ne soit pas perturbée dans les MEFs n'exprimant pas cette protéine, la réplication de la bactérie est inhibée<sup>113</sup>.

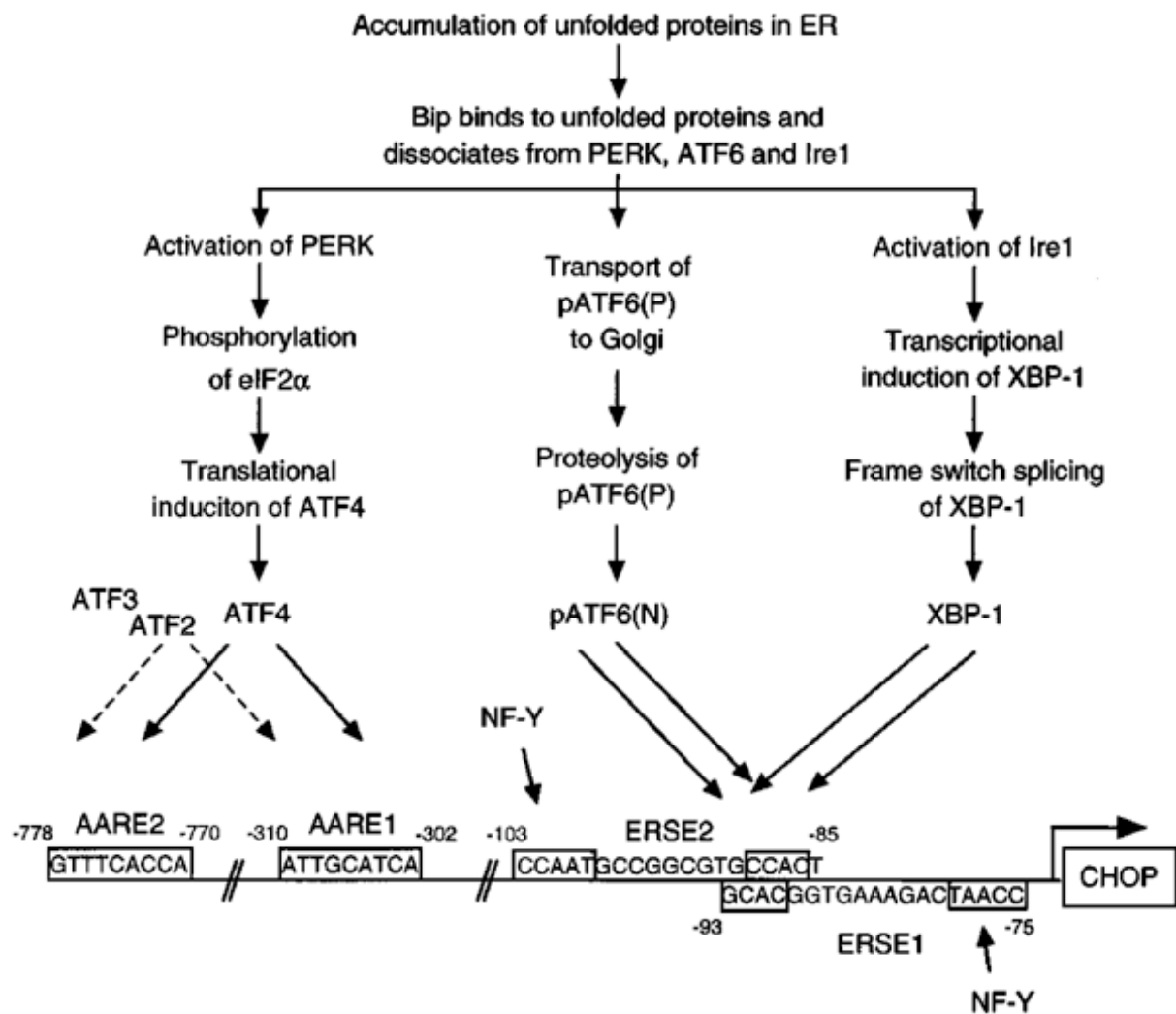
Etant donné l'implication de IRE1 dans le processus de réponse UPR, les auteurs ont étudié l'implication des autres acteurs de cette réponse tels que l'activation de PERK et ATF6. Ils ont conclu que ces derniers n'étaient pas nécessaires à la réplication de la bactérie<sup>113</sup>. Par contre, le (les) mécanisme(s) par le(s)quel(s) IRE1 permet la réplication bactérienne n'est (ne sont) pas encore connu(s).

L'activation d'une réponse UPR classique ne semble donc pas nécessaire pour la réplication de *Brucella*. Cependant, comme illustré ci-dessus, de nombreux pathogènes intracellulaires sont capables d'activer et/ou moduler spécifiquement une ou plusieurs voies de signalisation de l'UPR comme l'induction de CHOP-10 dans des macrophages exposés à *Brucella* (Nicolas Lebailly, Mémoire 2011).

## III. CHOP10

### 3.1. Famille des C/EBPs

CHOP10 est une protéine de 29 kDa qui a d'abord été identifiée comme appartenant à la famille des facteurs de transcription C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*) qui comprend 6 membres : C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$ , C/EBP $\gamma$  et C/EBP $\zeta$  (CHOP10)<sup>119</sup>. Les différents membres partagent des similarités de structure et de fonction<sup>119</sup>. Ces facteurs de transcription sont actifs sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères, toutes les combinaisons de dimères étant possibles<sup>120</sup>. Chacun des membres est composé de deux domaines caractéristiques des facteurs de transcription à savoir un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de transactivation (Figure 1.18.). Du côté N-terminal, CHOP10 possède un domaine transactivateur contenant deux résidus sérine qui doivent être phosphorylés par la p38 MAPK afin de conférer au facteur de transcription son activité maximale<sup>121</sup>. Du côté C-terminal, un domaine « *basic leucine zipper* » composé d'une région riche en acides aminés basiques et impliquée dans la liaison à l'ADN est suivie d'un motif « leucine zipper », permettant la dimérisation du facteur de transcription. Tous les C/EBPs, sauf CHOP10, possèdent un domaine bZIP très conservé qui leur permet de lier l'ADN au niveau de la séquence consensus A/GTTGCGC/TAAC/T<sup>122</sup>. CHOP10, quant à lui, possède un bZIP dégénéré contenant deux substitutions responsables de la disruption de l'hélice alpha<sup>123</sup>. Lorsque CHOP10 dimérise avec un autre membre de la famille des C/EBPs, le dimère n'est pas capable de lier l'ADN au niveau de la séquence consensus<sup>123</sup>. Par contre, en conditions de stress, l'hétéro-dimère est capable de se lier à une autre séquence spécifique, PuPuPuTGCAAT(A/C)CCC (Pu = purine)<sup>124</sup>. En se liant au niveau de l'ADN, CHOP10



**Figure 1.19. Structure du promoteur de CHOP10.**

Le promoteur de CHOP10 possède au moins 4 séquences régulatrices agissant en *cis* : deux AARE (*amino acid response element*) ainsi que deux ERSE (*endoplamic reticulum stress response element*). Les deux séquences ERSE sont situées en sens opposé et se recouvrent sur 9 nucléotides. En conditions de stress du RE, la transcription de CHOP est régulée par les trois voies de l'UPR. En effet, ATF6 et XBP1 vont se lier aux deux séquences ERSE en association avec le facteur NF-Y. ATF4 est un facteur qui va se lier aux séquences AARE. De plus, ATF3 et ATF2 sont aussi capables de lier les séquences AARE (Oyadomari and Mori, 2004<sup>40</sup>).

régule donc la transcription de gènes cibles de deux manières différentes : de manière indirecte en agissant comme un dominant négatif des autres C/EBPs et de manière directe en activant la transcription de ses nombreux gènes cibles<sup>124</sup>, parmi lesquels on retrouve GADD34<sup>125</sup> et Ero1 $\alpha$  (ER oxidase-1 $\alpha$ )<sup>125,126</sup>.

De plus, CHOP10 est capable de moduler indirectement la transcription d'autres gènes cibles et ce, sans se lier à l'ADN, mais en interagissant et/ou en séquestrant des facteurs de transcription impliqués dans leur régulation. Il est par exemple capable d'augmenter l'activité d'AP-1 (*Activating Protein-1*) en interagissant le dimère c-Jun/c-Fos<sup>127</sup>, ou, au contraire, d'inhiber la liaison à l'ADN du facteur TCF (*T-cell factor*), un facteur de transcription recruté suite à la liaison de la  $\beta$ -caténine ( $\beta$ -cat) au niveau du promoteur d'un gène cible de la voie Wnt<sup>128</sup> (voir point 4.2.).

L'utilisation de souris transgéniques mutées pour les différents membres de cette famille a montré que les C/EBPs interviennent dans des processus cellulaires variés tels que la prolifération, la différenciation et la mortalité/survie cellulaire<sup>119</sup>.

### 3.2. CHOP10 ou GADD153

CHOP10 est aussi connu sous le nom de GADD153 (*Growth Arrest DNA Damage 153*). Cette famille de gènes comprend 3 membres : GADD34, GADD45 et GADD153, qui ne partagent pas de similarités de structure ni de fonction. Ces protéines sont regroupées sur base du fait qu'elles sont activées en réponse à des stress génotoxiques ainsi que des signaux d'arrêt de la croissance<sup>119</sup>.

Ce nom lui a été attribué dans une étude qui montre que le gène codant pour CHOP10 est induit lors d'expositions aux ultraviolets (UV) ou aux agents alkylants (MMS), deux conditions connues pour induire des dommages à l'ADN<sup>129</sup>. Il a également été montré que CHOP10 est exprimé en réponse à une privation de glucose ou d'acides aminés<sup>121</sup>. En fait, on sait maintenant que l'induction de CHOP10 en réponse aux UV et dommages à l'ADN<sup>130</sup>, autrefois interprétée comme étant le résultat de dommages à l'ADN, est en fait reliée à un stress du réticulum<sup>131</sup>. En effet, le MMS induit l'alkylation des résidus cystéine empêchant ainsi le bon repliement des protéines alors que la privation en glucose empêche la N-glycosylation des protéines, les empêchant de passer le contrôle de qualité dans le RE et induisant l'UPR. Il semble donc que l'induction de CHOP10 soit plus sensible au stress du RE qu'aux dommages à l'ADN<sup>131</sup>.

### 3.3. Régulation de CHOP10

#### 3.3.1. Régulation transcriptionnelle

##### a. Régulation dans le cadre de l'UPR

CHOP10 est exprimé de manière ubiquiste mais à un niveau très faible et parfois indétectable. En conditions de stress du RE, l'expression du gène est induite et le facteur est transloqué du cytosol au noyau<sup>123</sup>. La régulation de l'expression du gène *Ddit3* est essentiellement transcriptionnelle. En effet, le gène codant pour CHOP10 semble être un des gènes qui est le plus intensément induit lors de l'UPR<sup>132</sup>, ce qui est en accord avec le fait que les régulateurs transcriptionnels (XBP1s, ATF-6 et ATF-4) activés en aval des trois voies de signalisation de l'UPR participent à l'induction de la transcription du gène codant pour CHOP10.

Le promoteur de *Ddit3* comprend au moins deux séquences consensus ERSE (*ER stress response element*) et deux séquences consensus AARE (*amino-acid response element*). Comme illustré à la Figure 1.19., les deux séquences ERSE (ERSE1 et ERSE2) sont en direction opposée avec un recouvrement de 9 nucléotides<sup>133,134</sup>. ATF4 va se lier au niveau des séquences AARE 1 et 2. XBP1 et ATF6 sont actifs sous forme d'homo- ou d'hétérodimères et





avec NF-Y (*Nuclear transcription factor Y*) vont pouvoir se lier au niveau des séquences ERSE 1 et 2<sup>133-135</sup> (Figure 1.19.). Si les 3 voies exercent un contrôle sur la transcription du gène codant pour CHOP10, il a été montré que la voie dépendante de PERK et donc d'ATF4 a un contrôle plus important que celui des voies IRE1/XBP1s et ATF6<sup>97,136</sup>.

#### **b. Régulation par les facteurs des transcription C/EBP**

En exposant les cellules hépatiques à du LPS de *E. coli*, on observe une induction de CHOP10 dans le cadre d'une réponse de phase aiguë. Une étude a montré que cette induction est dépendante de l'activation de la transcription par C/EBP $\beta$ <sup>137</sup>. Notons que CHOP est donc capable de réguler sa propre transcription. Lorsque CHOP10 est présent, il va hétérodimériser avec C/EBP $\beta$  et donc empêcher la liaison à son promoteur<sup>138</sup>.

#### **c. Régulation par les facteurs de transcription ATF**

D'autres facteurs de transcription de la famille des ATFs : ATF2, ATF3 et ATF5, semblent également impliqués dans la régulation de la transcription de CHOP10, mais leur rôle pourrait être contexte spécifique. Quelques exemples de situations dans lesquelles les facteurs ATFs sont impliqués dans la régulation de CHOP10 sont listés ci-dessous.

#### **Carence en acides aminés**

Une étude a montré que dans des cellules MEFs déficientes pour ATF2, l'induction de CHOP10 en réponse à une carence en acides aminés comme la leucine n'est pas observée. De plus, les auteurs ont mis en évidence, par des études de délétions de promoteurs, que dans ces conditions, le facteur liait la séquence consensus AARE<sup>139</sup>.

#### **Intoxication au CCl<sub>4</sub>**

Le CCl<sub>4</sub> est un composé chimique présent dans de nombreux solvants et détergents<sup>140</sup>. Lors d'une intoxication au tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>), l'abondance d'ATF3 et de CHOP10 varie de manière inverse dans les cellules hépatiques (*in vivo* et *in vitro*), suggérant qu'ATF3 pourrait inhiber l'expression de CHOP10<sup>141</sup>. Les auteurs sont parvenus à mettre en évidence, que dans ces conditions, ATF3 est capable d'inhiber la transcription de CHOP10 en se liant au site composite C/EBP-ATF se trouvant dans le promoteur de CHOP10<sup>142</sup>.

#### **Pathologie du diabète : cytokines et acides gras libres**

L'expression de *Ddit3* peut être activée dans le cadre d'une UPR induite par des stimuli rencontrés dans les conditions pathologiques telles que celles du diabète. Une étude a analysé l'expression de CHOP10 dans un modèle mimant ces conditions : il s'agit de cellules INS-IE (cellules  $\beta$  productrices d'insuline) exposées à des cytokines (IFN $\gamma$  (interféron- $\gamma$ ) et IL-1 $\beta$ ) ou des acides gras libres (palmitate)<sup>143</sup>.

Une incubation avec les cytokines va mener à la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  et donc une augmentation de l'abondance d'ATF4, qui pourra se lier au promoteur de CHOP10. Les acides gras libres, quant à eux, vont induire la phosphorylation de PERK et donc l'activation de la voie en aval de celle-ci, ce qui mènera également à l'induction de CHOP10 par le facteur ATF4<sup>143</sup>. Les auteurs ont montré que l'induction de CHOP10 en réponse tant aux cytokines qu'au palmitate était due à une liaison précoce du facteur de transcription AP-1 suivie d'une liaison plus tardive d'ATF4. Bien qu'ATF4 soit probablement activé par la voie de signalisation dépendante de l'UPR, il semble que l'induction d'AP-1 par les cytokines soit indépendante de celle-ci<sup>143</sup>. De plus il existe un moyen de régulation supplémentaire de l'induction de CHOP10 puisque la JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), activée lors d'une



stimulation des cellules par l'IL-1 $\beta$ <sup>144</sup>, est capable de phosphoryler et donc augmenter l'activité des facteurs AP-1<sup>145</sup>.

### **Stress à l'arsenic**

Une étude a montré que les facteurs de transcription ATF3 et ATF4 sont également impliqués dans la régulation de l'expression de CHOP10 lors d'un stress à l'arsenic. La régulation et donc l'expression de CHOP10 en réponse à ce stress comporte deux phases. Ces deux facteurs se lient à la même séquence consensus (et entrent donc en compétition) dans le promoteur de CHOP10, le site C/EBP-ATF. Rapidement après l'initiation du stress, ATF4 se lie au promoteur et induit la transcription de CHOP10. Plus tardivement après l'initiation du stress, c'est ATF3 qui va lier la même séquence et inhiber la transcription de CHOP10. Il semble que ce « switch » de facteurs de transcription soit dû à une disponibilité et/ou abondance différentielle des deux facteurs au cours du temps<sup>146</sup> ainsi qu'à une affinité différente des facteurs de transcription pour la séquence consensus<sup>138</sup>.

De plus, une analyse par délétions et mutagenèse dirigée du promoteur de *Ddit3* a montré qu'ATF5 peut potentiellement induire la transcription de CHOP10, en réponse à la présence d'arsenic, en se liant au niveau de la séquence AARE1<sup>147</sup>. De plus, ces auteurs ont montré que les cellules HepG2 n'exprimant pas ATF5 ont un taux d'induction de CHOP10 en réponse à une exposition à l'arsenic inférieur à celui observé dans des cellules qui expriment ce facteur de transcription<sup>147</sup>.

#### **3.3.2. Régulation post-transcriptionnelle**

L'expression de CHOP10 est aussi régulée à un niveau post-transcriptionnel. En effet, une étude a montré qu'en conditions de privation de leucine, la stabilité de l'ARNm codant pour CHOP10 est augmentée par rapport à une condition où la leucine est abondante<sup>148</sup>. Cependant, le mécanisme responsable de cette stabilité différentielle n'est pas encore élucidé. De plus, en conditions basales, il semble que le transcrit codant pour CHOP10 n'est pas/peu traduit en protéines. En effet, dans la séquence 5' UTR (*untranslated region*) de ce transcrit se trouve une uORF (*open reading frame*), encodant pour un petit peptide, qui va inhiber la traduction de l'ORF principale se trouvant en aval et ce, probablement en empêchant la liaison du ribosome à son site d'initiation de la traduction<sup>149</sup>.

#### **3.3.3. Régulation post-traductionnelle**

Comme déjà mentionné précédemment, en conditions de stress, il a été montré que CHOP10 est phosphorylé au niveau de deux résidus sérine par la p38 MAPK, ce qui permet au facteur de transcription de devenir pleinement actif<sup>121</sup>. Par contre, une phosphorylation par la CK2 (Casein kinase-2) a un effet inhibiteur sur l'activité transactivatrice de CHOP10<sup>150</sup>.

Nous allons terminer cette introduction par une brève description du rôle et des fonctions de CHOP10 dans divers processus biologiques comme la mort/survie cellulaire, la régulation de la production de cytokines, l'interférence avec la voie de signalisation des Wnts et très récemment découvert, sa participation au contrôle de l'expression de certains micro-RNA (miRNA).

### **3.4. Gènes régulés par CHOP10 et implication du facteur de transcription dans de nombreux processus biologiques**

#### **3.4.1. CHOP10 et apoptose**

CHOP10 est communément considéré comme un agent pro-apoptotique. En effet, de nombreuses études ont montré qu'une surexpression du gène codant pour CHOP10 se traduit



par un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose<sup>151-154</sup>, alors que des souris CHOP10<sup>-/-</sup> développent moins d'apoptose induite par un stress du RE<sup>154-156</sup>.

Etant donné que lorsque l'on mute le partenaire de dimérisation le plus courant de CHOP10, c'est-à-dire C/EBP $\beta$ <sup>157</sup>, on observe une certaine résistance à l'apoptose induite par le stress du réticulum, il semble que CHOP10 induise l'apoptose via une modulation de la transcription de gènes impliqués dans la survie et/ou la mort cellulaire<sup>155</sup>.

Premièrement, il a été montré que CHOP10 est responsable d'une répression de la transcription du gène codant pour la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)<sup>151,158</sup>, une protéine responsable de la séquestration dans le cytoplasme de Bax (*Bcl-2 associated X protein*), une protéine pro-apoptotique, ainsi que d'une activation de la transcription du gène codant pour Bim<sup>159</sup>, la protéine responsable de la translocation de Bax, du cytosol à la membrane mitochondriale externe. De plus, l'abondance de Bax est augmentée en conditions d'apoptose induite par un stress du RE, et ce, d'une manière dépendante de CHOP10<sup>160</sup>. La modification d'abondance de ces trois protéines va permettre la translocation de Bax à la mitochondrie et ainsi permettre la formation de pores à travers la membrane mitochondriale externe, la sortie du cytochrome c permettant la formation de l'apoptosome et donc l'intégration et l'amplification de la signalisation apoptotique<sup>158</sup>.

Un autre gène dont la régulation semble dépendre de CHOP10 est nommé *DOC1* (*Downstream of CHOP-1*). Ce gène code pour une anhydrase carbonique de type VI inductible par le stress. Son expression semble avoir pour effet un pompage de protons et donc une acidification du milieu intracellulaire<sup>161</sup>. Etant donné que la capacité de Bax à former des pores à travers les membranes est dépendante du pH<sup>162</sup>, il semble que la surexpression de *DOC1* favorise l'activité pro-apoptotique de Bax. De même, *DOC6* (*Downstream of CHOP-6*) est un homologue de la la gelsoline, une protéine connue pour être clivée par la caspase 3. Le fragment amino-terminal généré par clivage est responsable d'une réorganisation du cytosquelette d'actine observé lors de l'apoptose<sup>163</sup>.

Un deuxième moyen par lequel CHOP10 induit l'apoptose est la génération d'un stress oxydatif. En effet, CHOP10 induit la transcription du gène codant pour *ERO1 $\alpha$*  (*ER oxidase 1 $\alpha$* )<sup>125</sup>, une protéine impliquée dans la formation de ponts disulfure des protéines contenues dans le RE. En conditions de stress du RE, il semble que la protéine *ERO1 $\alpha$*  contribue à former un environnement hyper-oxydant au sein du RE. En effet, il a été montré que l'apoptose induite par un stress du RE semble impliquer l'activation d'une voie de signalisation pro-apoptotique dépendante du calcium, faisant intervenir la *CaMKII* (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*)<sup>164</sup>. Pour permettre cette augmentation du calcium cytosolique, *ERO1 $\alpha$*  activerait *IP3R1* (*inositol triphosphate receptor 1*), un canal calcique situé en membrane du RE, suite à la formation d'un pont disulfure au niveau d'une boucle intra-luminale de la protéine<sup>125</sup>. La sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytosol va augmenter la concentration du messenger secondaire et permettre l'activation de la *CaMKII*, qui à son tour peut activer la *NADPH oxydase Nox2* et donc la production de ROS. Ces ROS vont premièrement favoriser l'apoptose et deuxièmement agir comme feedback positif pour amplifier le système en activant *CaMKII*<sup>159,164</sup>. CHOP10 favorise également un environnement oxydatif/stress oxydant en déplaçant le stock de glutathion, et donc en limitant les défenses anti-oxydantes de la cellule<sup>158</sup>.

Troisièmement, CHOP10 induit la transcription de *GADD34*, qui, comme nous l'avons vu, est un gène codant pour une phosphatase capable de déphosphoryler *eIF2 $\alpha$*  et ainsi promouvoir la traduction des ARNm en protéines<sup>165</sup>.

Quatrièmement, différents gènes impliqués dans les voies de signalisation conduisant à l'apoptose comme les gènes codant pour les récepteurs de mort, *DR5* (*death receptor-5*)<sup>166</sup> et *TRAIL-R2* (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2*), ainsi que *TRB3* (*tribbles-related protein-3*) sont induits par CHOP10<sup>167</sup>.



Cependant, il est important de noter que le rôle de CHOP10 dans l'apoptose dépend des conditions rencontrées. En effet, il a été montré qu'un traitement des macrophages RAW264.7 au LPS soluble d'*E. coli* induit une réponse UPR<sup>168</sup>. Cependant, dans ces conditions l'induction de CHOP10 est retardée par rapport à l'induction de facteurs protecteurs tels que BiP. De plus, le taux d'induction de CHOP10 est plus faible que celui observé lors d'une stimulation avec des inducteurs classiques de la réponse UPR tels que la thapsigargine (TG), qui induit un stress du RE en perturbant la concentration en  $Ca^{2+}$  via une inhibition des pompes SERCA (*sarco-/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase*). De plus, un prétraitement avec du LPS rend les cellules résistantes à l'apoptose induite par un traitement à la TG<sup>168</sup>. Il semble donc qu'un traitement des macrophages RAW264.7 avec du LPS soluble d'*E. coli* induise l'expression de nombreux gènes codant pour des cytokines, qui, pour être sécrétées doivent passer par le RE. Cela provoque une surcharge de RE qui, suite à un stress UPR va pouvoir être résolue grâce aux protéines permettant la réponse adaptative. Le RE sera donc adapté aux conditions de stress lorsque CHOP10 est activé, ce qui pourrait expliquer pourquoi, dans ces conditions, l'apoptose n'est pas observée.

De plus, une étude réalisée au laboratoire a montré que dans les cellules endothéliales subissant un stress oxydatif causé par une incubation avec SIN-1 (*sydnonimine* - un donneur de peroxyde nitrique), on observe l'activation d'une UPR dans laquelle CHOP10 n'a pas de rôle pro-apoptotique<sup>169</sup>.

Enfin, il a même été montré que dans des cellules neuronales soumises à l'hypoxie, CHOP10 aurait un effet protecteur contre la mort cellulaire. En effet, dans ces conditions, l'invalidation de CHOP10 limite la survie des cellules alors qu'une surexpression l'augmente<sup>170</sup>.

En conclusion, il semble que la surexpression de CHOP10 ne soit pas toujours associée à une augmentation de la mortalité cellulaire par apoptose.

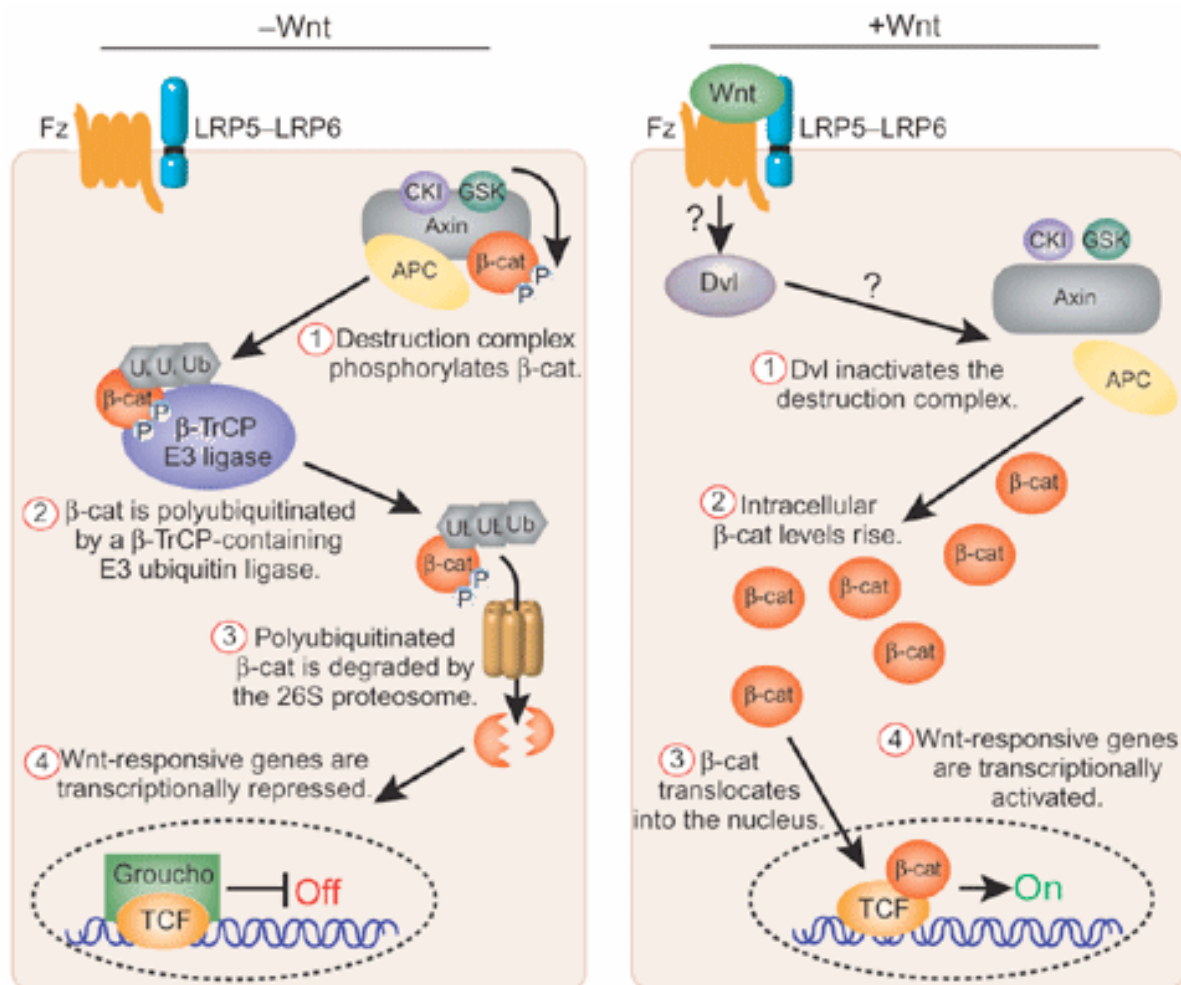
### 3.4.2. CHOP10 et la régulation de la production de cytokines

Les cytokines sont des médiateurs solubles impliqués dans la communication intercellulaires. Comme nous l'avons évoqué ci-dessus dans le point 4.1., elles jouent un rôle capital dans le développement d'une réponse immunitaire puisqu'elles vont être responsable de la communication entre différents effecteurs du système immunitaire et ainsi permettre l'orientation d'une réponse immunitaire adaptée à la situation rencontrée. Il a été montré, dans plusieurs études, que CHOP10 est capable de réguler, de manière indirecte, la production de cytokines. Voici quelques exemples dans lesquels CHOP10 est rapporté comme un régulateur de la production/maturation de cytokines.

Premièrement, lors d'une UPR dans des cellules épithéliales de l'intestin humain, CHOP10 est capable d'induire la production d'IL-8. En effet, en séquestrant le facteur de transcription C/EBP $\beta$ , CHOP10 empêche ce facteur de se lier au promoteur de PPAR $\gamma$  (*peroxysome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ) et donc d'induire sa transcription. En diminuant la production de PPAR $\gamma$ , CHOP10 va limiter l'effet inhibiteur qu'exerce PPAR $\gamma$  sur l'activité du facteur NF-kB (*Nuclear factor- $\kappa$ B*) (PPAR $\gamma$  induit la translocation de la sous unité p65 d'NF-kB hors du noyau<sup>171</sup>) et ainsi permettre l'induction (NF-kB-dépendante) de la production d'IL-8<sup>172</sup>.

Deuxièmement, CHOP10 est connu pour réguler négativement l'expression de l'IL-6, également en séquestrant C/EBP $\beta$ . En effet, deux membres de la famille des facteurs de transcription C/EBP (C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ ) sont connus pour induire la transcription de diverses cytokines inflammatoires dont l'IL-6<sup>173</sup>. En réponse à une stimulation de





**Figure 1.20. Voie de signalisation Wnt/ β-caténine.**

En absence de Wnt, la β-caténine interagit avec un complexe protéique, comprenant l'axine, APC, CKI et GSK, qui est responsable de sa phosphorylation. Une fois phosphorylée, la β-caténine est reconnue par le complexe β-TrCP qui possède une activité ubiquitine ligase. Une fois polyubiquitinylée, la β-caténine sera dégradée par le protéasome. Dans ces conditions, TCF interagit avec Groucho pour former un complexe inhibiteur de la transcription des gènes cibles des Wnt.

Lorsqu'une protéine Wnt se lie à son récepteur Fz ainsi qu'à son co-récepteur LRP5-LRP6, Dvl sera phosphorylé et permettra la dissociation du complexe de phosphorylation de la β-caténine. Cette dernière va alors s'accumuler dans le noyau. Elle pourra alors interagir avec TCF et former un complexe activateur de la transcription d'une série de gènes cibles (Roberts et al, 2007<sup>41</sup>).

lymphocytes B murin au LPS de *E. coli*, CHOP10 est induit et va dimériser avec C/EBP $\beta$ . On observe alors une diminution de la liaison de C/EBP $\beta$  au promoteur de l'IL-6<sup>174</sup>. Cependant, ce phénomène semble contexte dépendant puisque dans les cellules A375, dérivées d'un mélanome humain, CHOP10 est rapporté comme un activateur de la transcription de l'IL-6. En effet, dans ces conditions, CHOP10 dimérise préférentiellement avec le régulateur négatif de la transcription de l'IL-6 (LIP – *Liver-enriched inhibitory protein*) et permet à la protéine LAP (*Liver-enriched activator protein*), un régulateur positif de la transcription de se lier au promoteur du gène codant pour l'IL-6<sup>175</sup>.

Troisièmement, CHOP10 est impliqué dans la maturation de l'IL-1 $\beta$  suite à une stimulation des macrophages au LPS de *E. coli*. En effet, dans ces conditions, CHOP10 va activer la transcription de la caspase 11<sup>168</sup>. La caspase 11 pourra ensuite cliver la caspase 1 qui, à son tour, clivera et activera la pro-IL1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  active<sup>176</sup>.

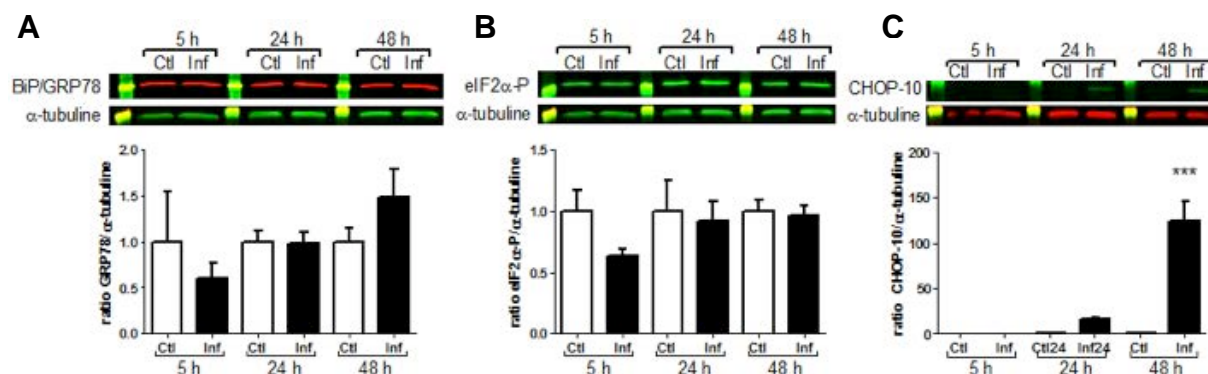
Un niveau de régulation supplémentaire pour CHOP10 est l'interférence avec des voies de signalisation moléculaire. En effet, CHOP10 est capable d'inhiber la transcription de gènes sans même se lier à l'ADN, uniquement en interagissant avec un facteur de transcription. Nous avons choisi de développer l'interférence avec la voie de signalisation Wnt car celle-ci est impliquée dans la modulation de la réponse de macrophages à une infection par *M. tuberculosis*<sup>177</sup>, un contexte qui pourrait également être intéressant dans le cadre de l'infection par *Brucella*.

### **3.4.3. CHOP et interférence avec la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ Cat**

Les Wnt sont des glycoprotéines sécrétées qui sont, entre autres, impliquées dans la détermination du destin cellulaire lors du développement embryonnaire des métazoaires<sup>178</sup>. En absence de stimulation, la  $\beta$ -caténine, est associée à un complexe protéique (formé de l'Axine, GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) et APC (*adenomatous polyposis coli*)), ce qui va permettre la phosphorylation de ce facteur de transcription entraînant sa dégradation par le protéasome 26S. La  $\beta$ -caténine n'étant pas capable de rejoindre le noyau, TCF (*T-cell factor*), une protéine partenaire de la  $\beta$ -caténine essentielle à son activité de facteur de transcription, va interagir avec Groucho et former un complexe qui inhibera la transcription des gènes cibles des Wnts. La liaison des Wnts à son récepteur, Frizzled (Fz) va induire la phosphorylation et donc l'activation de Dishevelled, qui va empêcher la formation du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine va donc s'accumuler dans le cytosol et entrer dans le noyau où, associée au TCF, elle va pouvoir induire la transcription de ses gènes cibles (Figure 1.20.). Une étude récente a montré que CHOP10 est un inhibiteur spécifique de cette voie de signalisation en interagissant physiquement avec TCF<sup>128</sup>. Cette interaction empêche la liaison du facteur à l'ADN et donc la transcription des gènes cibles du facteur TCF. De manière surprenante, cette fonction de CHOP10 ne requiert que le fragment NH<sub>2</sub>-terminal du facteur de transcription, ce qui n'est pas commun pour un facteur de transcription à motif bZIP<sup>128</sup>.

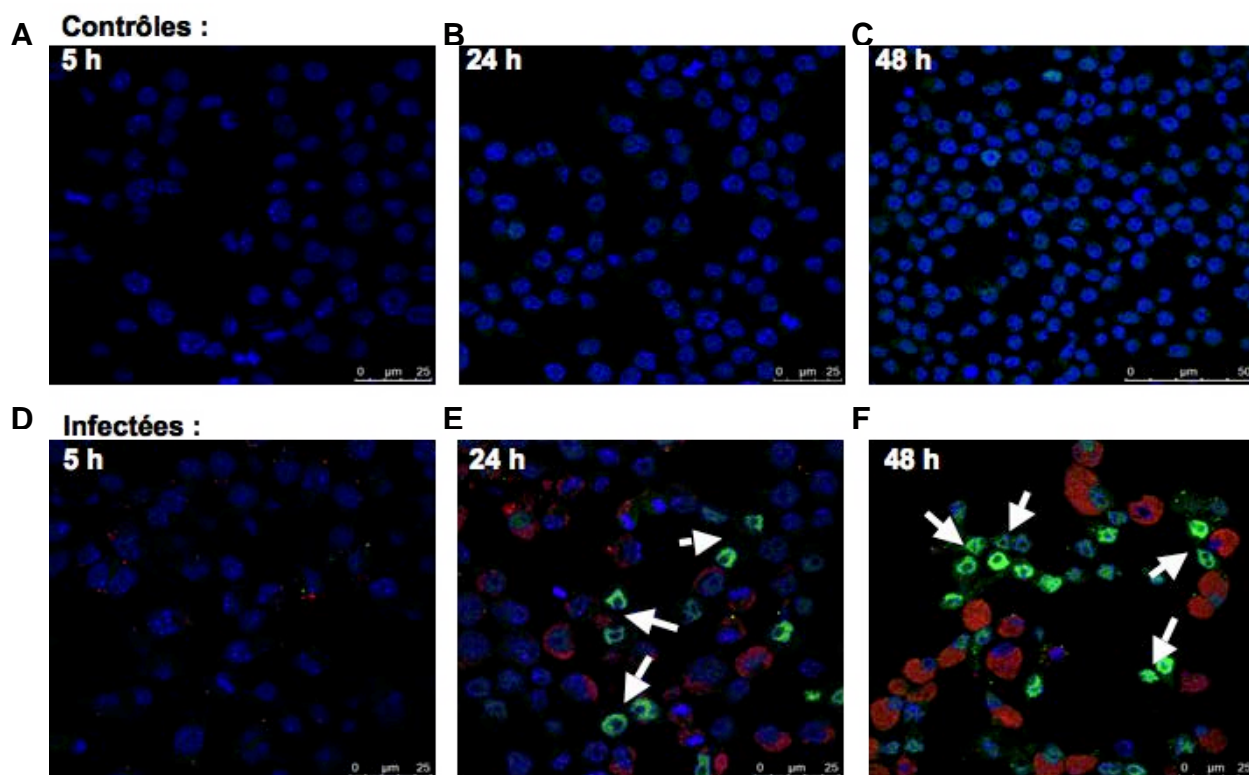
Il est intéressant de mentionner qu'il a été récemment montré que la voie Wnt est activée en réponse à une stimulation par différentes mycobactéries ainsi que par des structures bactériennes conservées telles que le LPS<sup>177</sup>. Une étude fonctionnelle suggère que cette voie de signalisation serait également impliquée dans l'induction de l'IL-12 et l'IFN $\gamma$  induite par la mycobactérie. La voie Wnt serait donc impliquée dans l'établissement de liens entre l'immunité innée et adaptative<sup>177</sup>.

Depuis la découverte de miRNA, les articles rapportant des applications de miRNA dans divers contextes biologiques ne cessent de paraître. En effet, les miRNA ont apporté un



**Figure 1.21. Analyse en western blot en fluorescence de l'effet d'une exposition à *B. abortus* sur l'abondance de différents marqueurs de la réponse UPR dans les macrophages RAW264.7.**

Parmi les différents marqueurs analysés, aucune différence significative d'abondance de la chaperonne BiP (A) ni de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2α (B) n'a pu être mise en évidence entre des cellules exposées à *Brucella* et des cellules contrôles et ce, quel que soit le temps PI testé. Par contre, l'abondance de CHOP10 est plus importante dans les cellules infectées analysées à 24 h PI et l'induction de l'expression de ce gène est encore plus importante à 48 h PI (C) (N. Lebailly, Mémoire 2011, données non publiées).



**Figure 1.22. Marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale de la localisation subcellulaire de CHOP10 dans des macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*.**

Premièrement, on ne détecte pas de marquage de CHOP10 dans les cellules contrôles réalisées aux différents temps (5, 24 et 48h) PI (A – C). De même, CHOP10 n'est pas détecté dans les cellules infectées à 5 h PI (D). Par contre on détecte CHOP10 au niveau des noyaux des cellules à 24 h PI et, de manière encore plus intense et dans un plus grand nombre de cellules à 48 h PI (E et F). Deuxièmement, on note que les cellules qui contiennent la bactérie n'expriment pas (ou peu) CHOP10 (E et F) (N. Lebailly, Mémoire 2011, données non publiées).

nouveau niveau de régulation de l'expression de gènes et donc de complexité à l'ensemble des processus biologiques. Une revue récente souligne le nombre important de miRNA impliqués dans la modulation des voies de signalisation en aval des TLR<sup>179</sup>. De même, de nombreux articles mentionnent l'implication de miRNA dans les réponses cellulaires générées lors d'une infection par différents pathogènes tels que *Francisella*<sup>180</sup> ou *Listeria*<sup>181</sup>.

A ce jour, aucune information n'est disponible quant à l'implication de miRNA dans la relation hôte-pathogène existant dans le cadre d'une infection par *Brucella*. Un projet de recherche visant à identifier ces miRNA différentiellement exprimés dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus* vient de débiter au laboratoire URBM.

Récemment, il a été montré que CHOP10 était capable de réguler l'expression d'un miRNA dans le cadre de la réponse UPR. Cela suggère que CHOP10 pourrait également réguler l'expression de miRNA dans un contexte d'infection.

#### **3.4.4. CHOP et les miRNAs**

L'équipe de Peter Walter a montré que parmi les 11 miRNAs dont l'abondance variait en réponse à un stress du réticulum, miR-708 est régulé par CHOP10. Des études de perte et gain de fonction ont permis d'identifier la rhodopsine comme une des cibles de miR-708<sup>182</sup>. La rhodopsine étant une protéine transmembranaire de la membrane plasmique, elle doit progresser au sein de la voie sécrétoire afin de rejoindre la destination qui permettra sa fonction. L'induction d'un miRNA ciblant ce transcrit en conditions de stress du RE est un moyen supplémentaire de limiter la quantité de protéines entrant dans l'organite et démontre que CHOP-10 pourrait contrôler le niveau d'expression de miRNAs<sup>182</sup>.

### **IV. Données préliminaires et objectifs du mémoire**

Etant donné que la niche répliquative de *B. abortus* est dérivée du réticulum endoplasmique, une étude préliminaire menée au laboratoire a caractérisé la réponse UPR au sein de macrophages RAW 264.7 infectés par la bactérie. L'abondance et/ou l'activité de différents marqueurs de la réponse UPR ont été analysée(s) dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus* (Nicolas Lebailly, Mémoire 2011).

De manière assez surprenante, parmi l'ensemble des marqueurs testés, CHOP10 est le seul à voir son abondance augmenter en réponse à l'exposition des phagocytes à la bactérie. En effet, l'expression de CHOP10 est induite de manière modérée à 24 h PI et de manière plus importante à 48 h PI (Figure 1.21.). Dans ce travail, CHOP10 semblait donc être induit de manière indépendante de la réponse UPR.

CHOP10 montrant un profil et une dynamique d'expression particuliers en réponse à l'infection, une analyse de la localisation subcellulaire du facteur de transcription et l'étude du degré d'homogénéité de la réponse au sein de la population des cellules RAW264.7 exposées à la bactérie ont également été réalisées dans ce travail par des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale. De manière surprenante, il a été montré que, pendant les 48 premières heures PI, CHOP10 est retrouvé dans les noyaux de cellules qui ne contiennent pas la bactérie et ne sont donc pas infectées (Figure 1.22.). Cette observation suggère qu'il existe un mécanisme de communication intercellulaire qui serait responsable de l'expression de CHOP10, d'abord observée dans les cellules non infectées.

A partir de ces résultats préliminaires et de cette hypothèse de travail qui a soulevé de nombreuses questions telles que : comment la bactérie est-elle capable d'induire la production d'un facteur de transcription dans les cellules qui ne la contiennent pas ? Est-ce que CHOP10 est induit dans un but de protection des cellules eucaryotes ou au contraire, pour faciliter leur



infection ? Ou encore, est-ce un processus spécifique à nos conditions expérimentales, ou retrouve-t-on ce phénomène dans des conditions d'infection naturelles ?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons déterminé trois objectifs principaux dans ce mémoire, qui sont de :

- 1) Compléter la caractérisation de l'expression de CHOP10 dans des cellules RAW264.7 exposées à *B. abortus*.
- 2) Déterminer le ou les mécanisme(s) responsables de l'induction de CHOP10 au sein des cellules RAW264.7 exposées à la bactérie
- 3) D'étudier les fonctions remplies par CHOP10 dans les macrophages exposés à *B. abortus*.

Précisons d'emblée que le troisième objectif ne sera discuté que dans la partie perspective, puisque nous n'avons malheureusement pas eu le temps de réaliser les expériences envisagées dans ce cadre.







Type cellulaire	Provenance	Référence
RAW264.7	American Type Culture Collection	TIB-71
MEF	Riken BioResource Center Cell Bank	RCB2710

**Tableau 2.1. Culture cellulaire - Provenance et référence des différentes lignées cellulaires utilisées**

Type cellulaire	Expérience	Type de plaque de culture	Volume de milieu (ml)	Densité cellulaire (cellules/puits)
RAW264.7	Extraction protéines	6 puits	2	$6.10^5$
	Extraction ARN	6 puits	2	$6.10^5$
	Préparation de milieux conditionnés	6 puits	2	$6.10^5$
	Cellules naïves	6 puits	2	$6.10^5$
	Immunocytochimie	12 puits	1	$3.10^5$
	Invalidation cytokines – anticorps neutralisants	12 puits	1	$3.10^5$
	Transfection avec des siRNA	12 puits	1	$1.10^5$
	Transfection des plasmides rapporteurs	12 puits	1	$2.10^5$
MEF	Immunocytochimie	12 puits	1	$4.10^4$

**Tableau 2.2. Culture cellulaire - Caractéristiques de l'ensemencement en fonction des différentes expériences réalisées.**

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellules RAW264.7 (American Type Culture Collection, USA)</li> <li>- Milieu de culture : <ul style="list-style-type: none"> <li>o Milieu DHG-L1 (Dulbecco's modified Eagle's medium + high glucose (4,5 g/l) + <math>\text{NaHCO}_3</math> (1,5g/l)) (Gibco, RU)</li> <li>o Sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVFi) (Gibco, RU)</li> </ul> </li> <li>- Boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75) (Corning Incorporated, USA)</li> <li>- Racloir à cellules de 30 cm (TPP, Suisse)</li> <li>- Pipettes stériles (Costar, USA)</li> <li>- Compteur de cellules (Invitrogen, USA)</li> <li>- Boîtes 6 ou 12 puits (Corning Incorporated, USA)</li> </ul>
---

**Tableau 2.3. Culture cellulaire – RAW264.7 – Matériel et milieu de culture utilisés**

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellules MEF (Riken BioResource Center Cell Bank, Japan)</li> <li>- Milieu de culture : <ul style="list-style-type: none"> <li>o Milieu DMEM High Glucose (DHG) (Dulbecco's modified Essential Medium + 4,5 g/L de glucose), contenant de la L-glutamine à 2 mM) (Lonza, Suisse)</li> <li>o Sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma-Aldrich, USA)</li> </ul> </li> <li>- Boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75) (Greiner Bio-one, Autriche)</li> <li>- HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) (Lonza, Suisse)</li> <li>- Trypsine/EDTA (Lonza, Suisse)</li> <li>- Pipettes stériles (Costar, USA)</li> </ul>
--

**Tableau 2.4. Culture cellulaire – MEF – Matériel et milieu de culture utilisés**

### 1. Cultures cellulaires

#### 1.1. Cellules eucaryotes

##### a. Type de cellules utilisées

La majorité des expériences effectuées dans le cadre de ce mémoire ont été réalisées sur des cellules RAW264.7. Ces cellules sont des macrophages murins dérivés d'une lignée leucémique induite par le virus d'Abelson dans les souris BALB/c<sup>11</sup>.

Une autre lignée cellulaire, les MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) a également été utilisée pour confirmer certains résultats. Il s'agit de fibroblastes murins issus d'embryons de 13,5 jours et transformés avec un vecteur d'expression de l'antigène T (pEF3221-T) du virus SV40 (*Simian Virus-40*) afin d'établir des lignées immortelles<sup>183</sup> (Pour la provenance des cellules, voir Tableau 2.1.).

##### b. Culture des cellules RAW264.7

Pour perpétuer la culture cellulaire, les cellules RAW264.7 sontensemencées à  $3.10^6$  cellules par boîte de 75 cm<sup>2</sup> (T75) en présence de 20 ml de DHG-L1 supplémenté de 10 % de SVFi et incubées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. La culture est ensuite diluée 10 fois tous les deux jours en conditions stériles.

Pour le repiquage, les cellules sont délicatement détachées de la surface de la boîte à l'aide d'un racloir et ensuite resuspendues par pipetage de manière à obtenir une solution homogène. Un volume de 2 ml de cette suspension cellulaire est transféré dans une nouvelle boîte de culture T75 contenant 18 ml de DHG-L1 + 10 % SVFi préchauffé à 37 °C. Les cellules sont ensuite incubées dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

Pour les différentes expériences, les cellules ont été repiquées à une densité appropriée (Tableau 2.2.) 24 h avant le début de l'expérience. Pour cela, la densité cellulaire est déterminée à l'aide d'un compteur de cellules. La suspension cellulaire est alors diluée de manière adéquate, placée en boîtes de culture multi-puits et les cellules sont incubées pendant 24 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> (Tableau 2.3.).

##### c. Culture des cellules MEFs

Pour perpétuer la culture cellulaire, les MEFs sont cultivées dans des boîtes de culture T75 en présence de 20 ml de DHG supplémenté de 10 % de SVF et incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. La culture est diluée 10 fois tous les 2 jours en conditions stériles. Au moment du repiquage, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées 1 fois avec 10 ml de HBSS afin de limiter la quantité de protéines sériques, puis avec 3 ml de trypsine/EDTA. Ensuite, les cellules sont incubées en présence de 1 ml de trypsine/EDTA pendant quelques minutes jusqu'au détachement complet des cellules. L'action enzymatique de la trypsine est neutralisée par l'ajout de 10 ml de milieu contenant 10 % de SVF. Après 10 passages dans une pipette stérile de 10 ml pour homogénéiser la suspension cellulaire, 1 ml de cette suspension est transféré dans une nouvelle boîte de culture T75 contenant 19 ml de milieu complet. Les cellules sont ensuite incubées dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

Pour l'expérience, les cellules ont étéensemencées en boîte de culture 12 puits sur des couvres-objets stériles à une densité de 40 000 cellules par puits 24 h avant le début l'expérience. Pour cela, la densité cellulaire a été déterminée à l'aide d'une chambre de Bürker et la suspension cellulaire a été diluée de manière adéquate. Les cellules ont ensuite étéensemencées et incubées pendant 24 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> (Tableau 2.4).

Espèce	Mutant	Description
<i>B. abortus</i>	2308 Sauvage	
	2308 mCherry	<i>B. abortus</i> 2308 Exprime la protéine fluorescente mCherry sous le contrôle d'un promoteur fort constitutif de <i>B. abortus</i> (PsojA, promoteur d'une Sec translocase).
	ΔvirB	Délétant total de l'opéron virB, système de sécrétion de type 4 de <i>B. abortus</i> 2308
<i>B. melitensis</i>	16M Sauvage	

**Tableau 2.5. Cultures bactériennes - Description des différentes souches et mutants utilisés**

<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2YT (16 g/l Bacto™ tryptone, 10 g/l BactoYeast extract and 5 g/l NaCl) (BD, USA)</li> <li>- Glycérol (VWR, Canada)</li> <li>- 2YT solide (32 g/l LB agar, 5 g/l d'extraits de levures, 6 g/l de peptone et 1 g/l d'agar) (BD, USA)</li> <li>- Kanamycine (Foremedium, RU)</li> <li>- Anses</li> <li>- Tube de 50 ml (Coring, USA)</li> <li>- Boîtes de pétri (Sarstedt, Allemagne)</li> </ul>
--

**Tableau 2.6. Culture bactérienne – Matériel et milieux de culture utilisés**

## 1.2. Souches bactériennes

### a. Souches bactériennes utilisées

Comme indiqué dans la légende des figures, par défaut, les expériences d'infection réalisées au cours de ce mémoire font appel à la souche *B. abortus* 2308 mCherry, un mutant de *B. abortus* 2308 qui exprime constitutivement la protéine fluorescente mCherry et qui est résistant à la kanamycine. Cependant, dans une expérience de comparaison, nous avons réalisé des infections de cellules RAW264.7 par différentes souches et mutants de *B. abortus* qui sont décrits dans le Tableau 2.5.

### b. Cultures bactériennes

Les bactéries sont stockées à -80 °C en phase exponentielle de croissance dans du milieu 2YT liquide supplémenté de 30 % de glycérol. Elles sont étalées sur boîtes de milieu 2YT solide (supplémenté de 10 µl/ml de kanamycine pour *B. abortus* 2308 mCherry) et incubées pendant 2 jours à 37 °C. Les bactéries sont ensuite cultivées dans 10 ml de milieu 2YT liquide (supplémenté de 10 µg/ml de kanamycine pour *B. abortus* 2308 mCherry) pendant 18 h à 37 °C sur un agitateur rotatif (170 rpm) (Tableau 2.6.).

## 2. Procédure d'infection cellulaire

### 2.1. Procédure classique

Les cellules RAW264.7 sontensemencées à la densité adéquate (Tableau 2) dans du DHG-L1 contenant 10 % de SVFi et incubées pendant 24 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. La culture bactérienne en milieu liquide est centrifugée à 3500 rpm pendant 10 min afin de culotter les bactéries. La surnageant est décanté et le culot bactérien est resuspendu dans 10 ml de DHG-L1 + 10 % SVFi. La densité optique (D.O.) de cette suspension est mesurée à 600 nm. Sachant qu'une unité de D.O. correspond à une densité bactérienne de  $3 \cdot 10^9$  de bactéries par ml, la suspension bactérienne est diluée dans du DHG-L1 + 10 % SVFi frais de manière à obtenir une MOI (*multiplicity of infection*) de 300, c'est-à-dire 300 bactéries par cellule eucaryote.

Pour les infections, le milieu de culture des cellules RAW264.7 est remplacé par cette suspension bactérienne (cellules infectées) ou par du DHG-L1 + 10 % SVFi frais (cellules contrôles). La boîte de culture est alors centrifugée à 1200 rpm pendant 10 min afin de favoriser la sédimentation et l'adhérence des bactéries aux cellules eucaryotes. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 1 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. A la fin de l'incubation, la suspension bactérienne est enlevée, les cellules sont rincées 3 fois avec 1 (boîtes de culture à 12 puits) ou 2 ml (boîtes de culture à 6 puits) de PBS et incubées dans du DHG-L1 + 10 % SVFi supplémenté de gentamycine 50 µg/ml à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> pour la durée désirée. Pour les temps PI longs, le milieu est remplacé par du DHG-L1 + 10 % SVFi frais supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine après 24 h d'incubation.

Pour l'infection de cellules MEF, la procédure d'infection est identique à celle décrite ci-dessus, par contre, l'incubation suivant celle-ci est différente. En effet, les cellules vont être incubées dans la gentamycine 50 µg/ml pendant 1 h, puis dans de la gentamycine 10 µg/ml pour le reste de l'incubation (Tableau 2.7.).

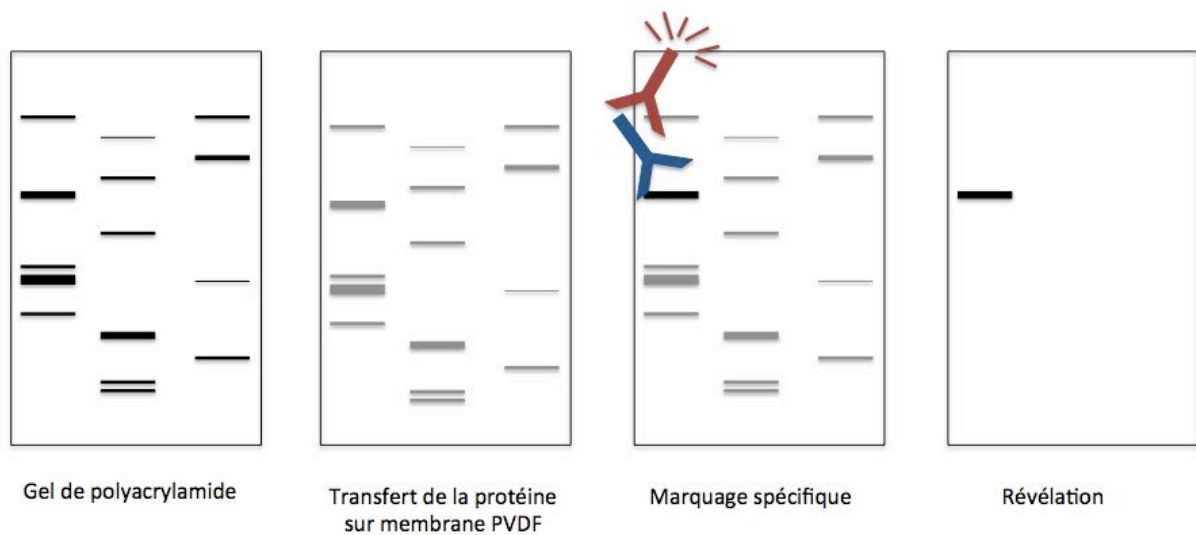
### 2.2. Infection par des bactéries mortes

Dans certaines conditions, l'infection a eu lieu avec des bactéries qui ont été tuées avant la procédure d'infection classique décrite ci-dessus. Pour ce faire, nous avons utilisé deux techniques différentes. Premièrement, les bactéries ont été tuées à la chaleur : la culture bactérienne est centrifugée à 3500 rpm puis le culot bactérien est resuspendu dans du DHG-



<p><b>Infection classique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Milieu de culture pour cellules RAW264.7 <ul style="list-style-type: none"> <li>o Milieu DHG-L1 (Dulbecco's modified Eagle's medium + high glucose (4,5 g/l) + NaHCO<sub>3</sub> (1,5g/l)) (Gibco, RU)</li> <li>o Sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVFi) (Gibco, RU)</li> </ul> </li> <li>- Milieu de culture pour <i>B. abortus</i> 2308 <ul style="list-style-type: none"> <li>o 2YT (16 g/l Bacto™ tryptone, 10 g/l BactoYeast extract and 5 g/l NaCl) (BD, USA)</li> </ul> </li> <li>- Boîtes de culture 6 ou 12 puits (Corning Incorporated, USA)</li> <li>- Gentamycine (Invitrogen, USA)</li> <li>- PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (0,9 % NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7,4) (Lonza, Suisse)</li> <li>- Centrifugeuse (Juan, France)</li> <li>- Spectrophotomètre (Thermo Scientific, USA)</li> </ul>
<p><b>Infection par des bactéries mortes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Milieu de culture pour cellules RAW264.7 <ul style="list-style-type: none"> <li>o Milieu DHG-L1 (Dulbecco's modified Eagle's medium + high glucose (4,5 g/l) + NaHCO<sub>3</sub> (1,5g/l)) (Gibco, RU)</li> </ul> </li> <li>- Paraformaldéhyde 4% (Merck, USA)</li> <li>- PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (0,9 % NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7,4) (Lonza, Suisse)</li> <li>- Bain-marie</li> <li>- Centrifugeuse (Juan, France)</li> <li>- Spectrophotomètre (Thermo Scientific, USA)</li> </ul>
<p><b>Contrôles réalisés</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (0,9 % NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7,4) (Lonza, Suisse)</li> <li>- Triton-X-100 (Sigma, USA)</li> <li>- Microtubes de 1,5 ml stériles (Sarstedt, Allemagne)</li> <li>- Vortex</li> <li>- Anses</li> <li>- Boîtes de pétri (Sarstedt, Allemagne)</li> <li>- Milieu d culture pout <i>B. abortus</i> 2308 <ul style="list-style-type: none"> <li>o 2YT solide (32 g/l LB agar, 5 g/l d'extraits de levures, 6 g/l de peptone et 1 g/l d'agar) (BD, USA)</li> </ul> </li> </ul>

**Tableau 2.7. Infections cellulaires – Matériel et réactifs utilisés**



**Figure 2.1. Western Blot en fluorescence - Principe**

Après la migration sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF où le marquage spécifique des protéines d'intérêt pourra s'effectuer. Un anticorps primaire reconnaissant spécifiquement la protéine sera ensuite reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui pourra être détecté à l'aide d'un scanner à infrarouges. (Modifié de <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/Westernblot.html> - visité le 15 octobre 2011)

L1. La suspension bactérienne est alors incubée pendant 1 h à 80 °C. Ensuite, la DO à 600 nm est mesurée au spectrophotomètre. Le reste des étapes de l'infection se déroule comme décrit au point 2.1. Dans une deuxième condition, les bactéries ont été fixées au PFA (paraformaldéhyde) : la culture bactérienne est centrifugée à 3500 rpm, puis le culot bactérien est resuspendu dans 5 ml de PFA 4 %. Les bactéries sont incubées pendant 10 min à température ambiante puis elles sont centrifugées à 3500 rpm pendant 10 min. Le culot bactérien est alors resuspendu dans 10 ml de PBS stérile. Ces deux dernières étapes sont répétées 3 fois. Au terme ces traitements, la DO à 600 nm est mesurée au spectrophotomètre et la suite de la procédure d'infection est identique à celle décrite au point 2.1. (Tableau 2.7.).

### 2.3. Contrôles CFU réalisés

Il existe deux types de contrôles CFU (*Colony Forming Unit*) réalisés. Premièrement, un contrôle de la dose infectante. Pour cela, 100 µl de la suspension bactérienne déposée sur les cellules lors de l'infection vont être dilués dans du PBS stérile et ce, de manière sériée (de 10 en 10) et 100 µl des dilutions adéquates seront étalés sur boîte de milieu 2YT solide afin de pouvoir dénombrer les CFU. Deuxièmement, dans certaines expériences, un puits de cellules infectées supplémentaire est prévu et ce, pour chaque temps post-infection d'une expérience donnée. Au terme de l'infection, les bactéries intracellulaires sont récupérées après une lyse des tapis cellulaires afin de compter les CFU et ainsi d'estimer/quantifier l'efficacité de l'infection. Les cellules exposées à *Brucella* sont rincées 3 fois avec 1 (boîte de culture à 12 puits) ou 2 ml (boîte de culture à 6 puits) de PBS à température ambiante puis lysées pendant 15 min avec le même volume de PBS contenant 0,1 % de Triton-X-100. Ensuite, le lysat cellulaire est homogénéisé et dilué de manière sériée (de 10 en 10) dans du PBS stérile (pour un volume final de 1 ml). Enfin, un volume de 100 µl des dilutions adéquates est étalé sur des boîtes de milieu 2YT solide. Ces boîtes sont incubées pendant 3 jours à 37 °C et les CFU sont comptées (Tableau 2.7.).

## 3. Analyse de l'abondance des protéines par la technique du Western Blot en fluorescence

### 3.1. Principe

Le Western Blot est une technique permettant la séparation électrophorétique de protéines selon leur poids moléculaire, leur détection et leur quantification relative. Tout d'abord, les échantillons protéiques (obtenus par la préparation de lysats cellulaires) sont dénaturés à haute température et en présence de SDS, qui va conférer une charge négative aux protéines. Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel d'acrylamide et la migration se produit sous l'effet d'un courant électrique. Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane où le marquage spécifique des protéines d'intérêt pourra s'effectuer. En effet, un anticorps primaire dirigé contre la protéine sera reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui pourra être détecté à l'aide d'un scanner à infrarouges<sup>184</sup> (Figure 2.1.).

### 3.2. Préparation des lysats cellulaires

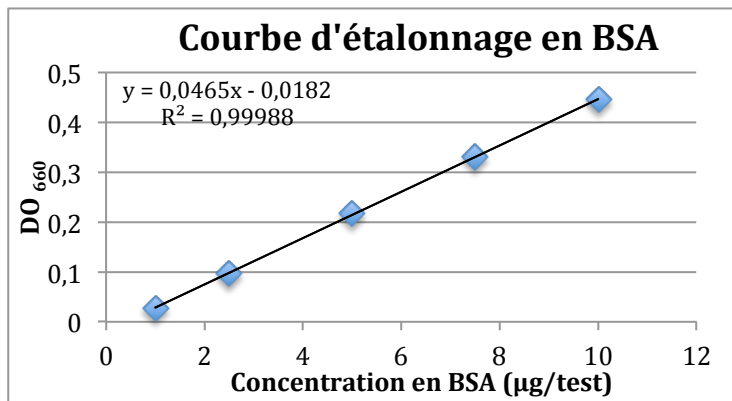
Les cellules RAW264.7 sont ensemencées dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules par puits dans du milieu DHG-L1 + 10 % SVFi avant d'être exposées à une suspension de *B. abortus* selon le protocole décrit au point 2.1. A 5, 24 ou 48 h PI, les cellules sont rincées 3 fois avec 2 ml du PBS à température ambiante. Ensuite, les cellules sont raclées dans 800 µl de PBS, la suspension cellulaire est transférée dans un microtube de 1,5 ml et centrifugée à 1000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est décanté et le culot cellulaire est resuspendu dans 50 µl de tampon de lyse dont la composition est reprise au Tableau 8. Les échantillons seront ensuite soumis à une agitation rotative à 4 °C pendant 30 min avant d'être centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants (= lysats





- Tampon de lyse :
  - Tampon DLA (7 M Urée, 2 M Thiourée, 4 % Chaps, 30 mM Tris; pH 8,5)
  - DTT à 60 mM (DiThioThreitol, Sigma-Aldrich, USA)
  - 4 % PIC (Protease Inhibitor Cocktail; Roche, Allemagne)
  - 4 % PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer; Roche, Allemagne)
- PBS (Phosphate Buffer Saline : 0,9 % NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4)
- Racloir à cellules de 25 cm (TPP, Suisse)
- Microtubes 1,5 ml (Sarstedt, Allemagne)
- Centrifugeuse à 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5415R, Allemagne)
- Tampon de charge (pour 5 ml):
  - 0,1g SDS (Merck, USA)
  - 1 ml glycérol (Merck, USA)
  - 2,5 ml Tris HCl 0,5 M pH 6,8 (Merck USA)
  - 1,5 ml H<sub>2</sub>O
- Bain marie

**Tableau 2.8. Western blot : préparation des lysats cellulaires – Matériel et réactifs utilisés**



**Figure 2.2. Western blot : Dosage protéique – Exemple de courbe d'étalonnage en BSA**

La concentration en protéines dans les échantillons peut être calculée à partir de l'équation de la droite d'étalonnage. A partir de la formule obtenue via la droite de calibrage, la concentration d'un échantillon est calculée comme suit :  $C_{\text{éch}} = (DO_{660} + 0,0182)/0,0465$

- Plaque 96 puits transparente (Greiner BioOne, Autriche)
- Réactif de Pierce (Thermo Scientific, USA)
- Ionic Detergent Compatibly Reagent (Thermo Scientific, USA)
- ASB (Albumine Sérique Bovine) (Sigma, USA)
- Spectrophotomètre (Bio-Rad, USA)
- H<sub>2</sub>O

**Tableau 2.9. Western Blot : dosage protéique – Matériel et réactifs utilisés**

- Gel NuPAGE Bis-Tris Mini Gel 10% (Invitrogen, USA)
- Bleu de charge NuPAGE (Invitrogen, USA)
- Cuve d'électrophorèse (Invitrogen, USA)
- Tampon d'électrophorèse NuPAGE : MOPS SDS (Invitrogen, USA)
- Antioxydant NuPAGE (Invitrogen, USA)
- Générateur de courant (Bio-Rad, USA)

**Tableau 2.10. Western Blot : électrophorèse – Matériel et réactifs utilisés**

- Appareil de transfert (GE Healthcare, Belgique)
- Papier Whatman (Merck, USA)
- Membrane PVDF (PolyVinylidene Fluoride) (Millipore, USA)
- Tampon de transfert NuPAGE
  - o 10 ml de Tampon de transfert concentré 20 x (Invitrogen, USA)
  - o 170 ml d'eau distillée
  - o 20 ml de méthanol (Merck, USA)
  - o 800 µl d'antioxydant (Invitrogen, USA)

**Tableau 2.11. Western Blot : transfert – Matériel et réactifs utilisés**

clairs ne contenant plus le matériel insoluble au tampon de lyse), sont récupérés et transférés dans un microtube 1,5 ml. Afin de pouvoir sortir les échantillons du BL3, ceux-ci sont supplémentés de 50 µl de tampon de charge et incubés pendant 4 min à 100 °C. Une fois refroidis, les échantillons peuvent être stockés à -20 °C (Tableau 2.8.).

### 3.3. Dosage de protéines par la méthode de Pierce

Ce dosage repose sur deux réactions. Premièrement, le milieu alcalin fourni par le réactif de dosage va permettre aux ponts peptidiques de réduire le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ . La quantité de  $\text{Cu}^+$  sera donc proportionnelle à la quantité de protéines totale présente dans la solution. Ensuite, l'acide bicinchoninique (BCA) va chélater le  $\text{Cu}^+$  et former un composé dont l'absorbance pourra être détectée à 562 nm (Chemistry of Protein Assays, Thermo Scientific).

Dans une plaque 96 puits, un volume de 10 µl d'une solution d'albumine sérique bovine (ASB) à différentes concentrations (0 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 µg par 10 µl) est ajouté dans les puits, de manière à réaliser une droite d'étalonnage (un exemple d'une droite d'étalonnage est présenté à la Figure 2.2.). Une fois l'ABS diluée de manière adéquate, les échantillons sont dilués 10 fois dans de l'eau (1 µl d'échantillon dans un volume final de 10 µl), et enfin 150 µl de réactif de Pierce supplémentés en réactif de compatibilité pour détergents ioniques (car présence de SDS dans l'échantillon) sont ajoutés à chaque puits (Tableau 2.9.). Après une incubation de 5 min, l'absorbance du produit de réaction est lue à 660 nm dans un spectrophotomètre. Enfin, la concentration en protéines dans les échantillons peut être calculée à partir de l'équation d'une droite d'étalonnage réalisée au moment de chaque dosage (Figure 2.2.).

### 3.4. Electrophorèse

Pour chaque condition, un volume d'extrait protéique correspondant à 20 µg de protéines est préparé dans un microtube de 1,5 ml. Ceux-ci sont ensuite supplémentés en bleu de charge pour NuPAGE (concentré 4 fois), incubés 10 min à 70 °C et enfin « spinés ».

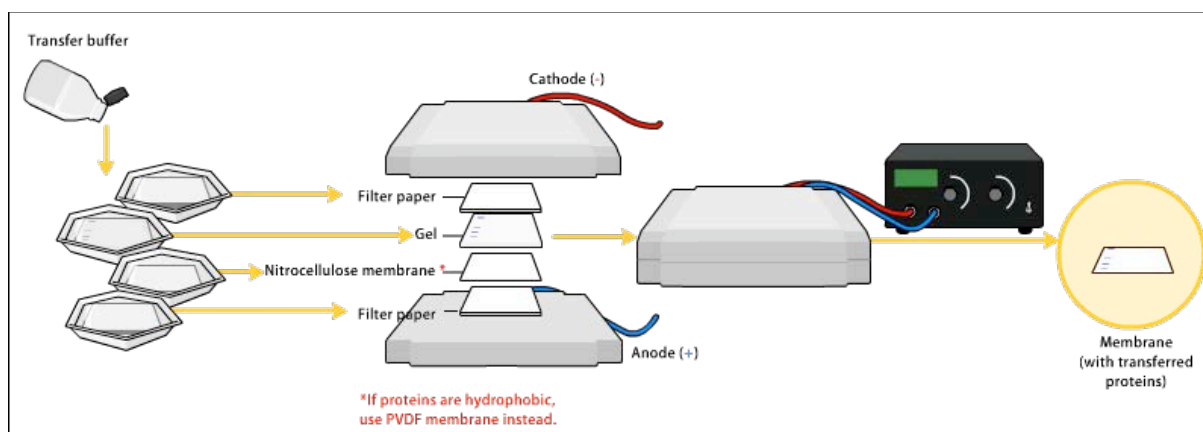
Le tampon de transfert stock est dilué 20 fois dans de l'eau distillée (volume final : 800 ml). Le peigne du gel est retiré et les puits sont rincés avec ce tampon de transfert. Le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse. Un volume de 200 ml de ce tampon de transfert contenant des antioxydants est placé entre les gels. Les 600 ml restant sont placés de part et d'autre des gels. Ensuite, les échantillons sont chargés dans les différents puits et les protéines sont résolues par migration dans le gel d'électrophorèse pendant environ 45 min grâce à une différence de potentiel constante de 200 V ( $V=RI$ ) circulant entre les deux électrodes (Tableau 2.10.).

### 3.5. Transfert

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et incubé pendant 10 min dans du tampon de transfert (Tableau 2.11.). La membrane de PVDF est humidifiée pendant 1 min dans du méthanol puis rincée dans de l'eau désionisée et enfin incubée pendant 10 min dans du tampon de transfert. Ensuite, le gel et la membrane sont assemblés selon un dispositif en sandwich (Figure 2.3.) dans la cuve de transfert. Chaque couche du montage est humidifiée avec du tampon du transfert et placée soigneusement de manière à ne pas avoir de bulle d'air. Une fois le montage terminé, le transfert « semi-dry » se déroule pendant 2 h sous un courant électrique de 1 mA/cm<sup>2</sup> (Tableau 2.11.).

### 3.6. Révélation et quantification de la protéine d'intérêt

A la fin du transfert des protéines, la membrane de PVDF est incubée pendant 1 h à température ambiante avec du tampon de blocage dilué 2 fois dans du PBS. Ensuite, elle est incubée pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué de manière



**Figure 2.3. Western Blot : Schéma du dispositif de transfert**

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et incubé 10 min dans du tampon de transfert. La membrane de PVDF est humidifiée pendant 1 min dans du méthanol puis rincée dans l'eau milliQ et enfin incubée 10 min dans du tampon de transfert. Ensuite, le gel et la membrane sont assemblés en sandwich dans la cuve de transfert. Chaque couche du montage est humidifiée avec du tampon du transfert et placée soigneusement de manière à ne pas avoir de bulle d'air. Une fois le montage terminé, le transfert « semi-dry » se déroule pendant 2 h sous un courant électrique de 1 mA/cm<sup>2</sup>. ([http://en.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot](http://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot) - visité le 15 octobre 2011)

Protéine	PM (kDa)	Références des anticorps	Dilution	Incubation	Hôte
CHOP10	30	(1) Santa-Cruz Sc-7351	1 : 200	30' – 37 °C	Souris monoclonal
		(2) Westburg, Netherlands IRDye 800 Anti-Rabbit IgG (H+L)	1 : 10 000	1 h – TA	Chèvre
ATF4	42	(1) Abcam Ab 105383	1 : 8000	1 h – TA	Lapin polyclonal
		(2) Westburg, Netherlands IRDye 800 Anti-Rabbit IgG (H+L)	1 : 10 000	1 h – TA	Chèvre
α-tubuline	55	(1) Sigma T5168	1 : 20 000	1 h – TA	Souris monoclonal
		(2) Westburg, Netherlands IRDye 680 Anti-Mouse IgG (H+L)	1 : 10 000	1 h – TA	Chèvre

**Tableau 2.12. Western Blot : révélation des protéines d'intérêt – Conditions d'utilisation des anticorps primaires (1) et secondaires (2) utilisés.**

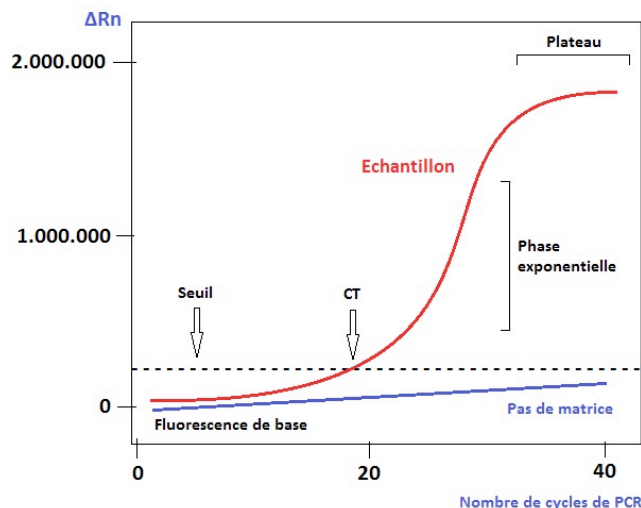
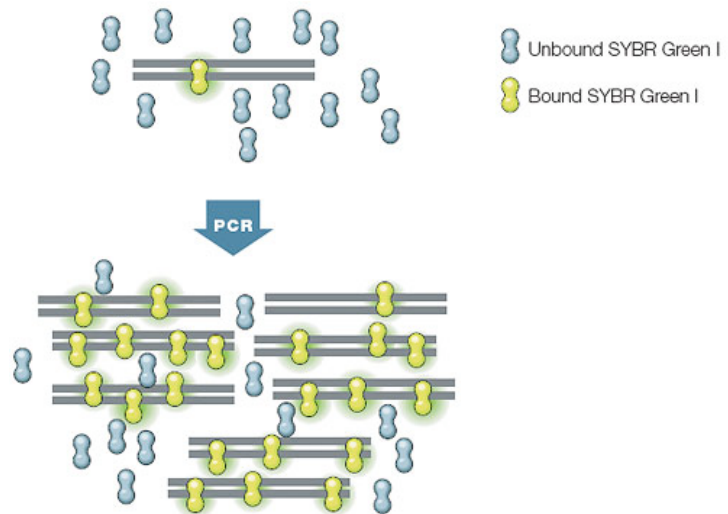
TA : température ambiante. IgG : Immunoglobuline de type G.

- Tampon de blocage LI-COR (LI-COR biosciences, USA)
- PBS (Phosphate Buffer Saline : 0,9 % NaCl, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH; 7,4)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, USA)
- PBS-T 0,1 % (PBS contenant du Tween 20 à 0,1%)
- Anticorps primaires et secondaires (voir tableau 15)
- Scanner Odyssey LI-COR (LI-COR Biosciences, USA)

**Tableau 2.13. Western Blot : révélation des protéines d'intérêt – Matériel et réactifs**

**Figure 2.4. RT-qPCR : principe – Mode de fonctionnement du SYBR Green**

Le SYBR Green est une cyanine asymétrique qui se lie de manière aspécifique à l'ADN double brin. Le composé possède une faible fluorescence lorsqu'il se trouve libre en solution mais l'intensité de sa fluorescence est jusqu'à 1000 fois plus élevée lorsqu'il lie l'ADN double brin. Le signal de fluorescence généré est donc directement proportionnel à la quantité d'ADN double brins présent et dépend donc de la quantité d'amplicons présente au début de la réaction (<http://www.bio-rad.com> - visité le 21 octobre 2011)



**Figure 2.5. RT-qPCR en temps réel – Principe**

Au fil des cycles d'amplification, l'ADNc cible sera amplifié spécifiquement grâce à un couple d'amorces s'hybridant de part et d'autre de sa séquence. La quantité d'ADN double brins va donc augmenter et le signal de fluorescence émis par le SYBR Green sera ainsi plus intense. Ce dernier est mesuré après chaque cycle d'amplification. Plus la quantité d'ADNc cible présente dans le mélange réactionnel avant le début de la réaction est importante, plus le nombre de cycles nécessaires pour que le signal fluorescent dépasse le seuil (Ct) est faible.

(modifié de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml> - visité le 21 octobre 2011)

Au BL2

- **RNeasy miniKit** (Qiagen, Allemagne)
  - Tampon RLT
  - Tampon RW1
  - Tampon RPE
  - Eau RNase-free
  - Colonne RNeasy spin
- Gants RNase Free
- Ethanol RNAase-free à 70 % (Merck, USA)
- Microtubes (Sarstedt, Germany)

AU BL3

- **miRNeasy miniKit** (Qiagen, Allemagne)
  - Colonnes RNeasyMini Spin
  - Micrtubes de 2 ml
  - Microtube 1,5 ml
  - H<sub>2</sub>O RNase-Free
  - Tampon de lyse QIAzol
  - Tampon RWT
  - Tampon RPE
- Chloroforme RNase-free
- Gants RNase-free
- Ethanol RNase-free à 70% et 100 % (Merck, USA)

**Tableau 2.14. Extraction d'ARN - Matériel et réactifs utilisés**

adéquate (Tableau 2.12.) dans du tampon de blocage contenant 0,1 % de Tween 20 (Licor-T 0,1 %). A la fin de l'incubation, la membrane est rincée 4 fois 5 min avec du PBS-T 0,1 % avant d'être incubée pendant 1 h avec l'anticorps secondaire dilué de manière adéquate (Tableau 15) dans du Licor-T 0,1%. La membrane est à nouveau rincée 4 fois 5 min avec du PBS-T 0,1 % puis 2 fois avec du PBS ne contenant pas de Tween 20. La membrane est alors séchée pendant 30 min à 37 °C et enfin analysée à l'aide du scanner à infrarouge Odyssey LICOR (Tableau 2.13.).

## **4. RT-qPCR quantitative en temps réel**

### **4.1. Principe**

L'ARN total est extrait des cellules. Une quantité définie de celui-ci est rétro-transcrite en ADNc, qui sera quantifié à l'aide d'une PCR quantitative en temps réel. Cette technique est au niveau réactionnel semblable à une PCR classique, c'est-à-dire qu'un fragment cible d'ADNc est amplifié spécifiquement grâce à un couple d'amorces s'hybridant de part et d'autre de l'amplicon. Sa particularité, comme son nom l'indique, est de mesurer la quantité d'ADN produit après chaque cycle d'amplification. La détection est possible grâce au SYBR Green (Figure 2.4.). Grâce à la cinétique d'apparition du produit, il est possible de déterminer la quantité d'ADNc d'intérêt initialement présente dans le mélange réactionnel PCR (Figure 2.5.). Cette technique permet donc de quantifier l'abondance relative des transcrits de protéines d'intérêt dans les différentes conditions étudiées.

### **4.2. Extraction d'ARN**

L'extraction d'ARN total est réalisée à l'aide du QiaCube (Qiagen, Allemagne)

#### **a. Au BL2 : RNeasy miniKit**

Au terme des différents temps post-infection, les cellules sont rincées 1 fois avec 1 (boîtes de culture à 12 puits) ou 2 ml (boîtes de culture à 6 puits) de PBS (4 °C) avant d'être lysées par l'addition de 350 µl de tampon de lyse RLT. Le lysat cellulaire est alors transféré et homogénéisé dans un microtube de 1,5 ml, auquel on ajoute 350 µl d'éthanol 70 %. Les lysats sont ensuite transférés sur une colonne RNeasy spin et centrifugés pendant 30 s à 12000 rpm. La colonne est rincée avec 700 µl de tampon RW1, puis deux fois avec 500 µl de tampon RPE. L'ARN est ensuite élué dans 30 µl d'eau RNase-free. L'ARN récolté de cette manière peut être stocké/conservé à -70 °C (Tableau 2.14.).

#### **b. Au BL3 : miRNeasy miniKit**

Aux différents temps post-infection, les cellules RAW264.7 sont rincées 1 fois avec 1 (boîtes de culture à 12 puits) ou 2 ml (boîtes de culture à 6 puits) de PBS avant d'être lysées par l'addition de 700 µl de Qiazol. Le lysat cellulaire est transféré et homogénéisé dans un microtube de 1,5 ml. Ensuite, les lysats sont supplémentés de 140 µl de chloroforme, vortexés pendant 1 min, incubés 5 min à température ambiante et enfin centrifugés 15 min à 12000 rpm à 4 °C. Au terme de cette centrifugation, la phase aqueuse et supérieure est transférée dans un nouveau microtube de 2 ml. Après cette étape, les échantillons peuvent être sortis du BL3 et les étapes suivantes seront réalisées à l'aide du Qiacube.

Un volume de 525 µl d'éthanol 100 % est ajouté à la phase aqueuse, l'homogénéisation se fait par pipetage. Ensuite, 700 µl du mélange sont transférés sur une colonne RNeasy et centrifugés à 8000 g pendant 15 s à température ambiante. Puis la même étape est réalisée pour le volume de l'échantillon restant. Ensuite, 700 µl de tampon RWT sont ajoutés sur la colonne et centrifugés pendant 15 s à 8000 g afin de rincer la colonne. De même, 500 µl de tampon RPE sont ajoutés et centrifugés pendant 15 s à 8000 g pour rincer la colonne une



- H<sub>2</sub>O RNase-free
- Gants RNase-free
- NanoDrop (ThermoScientific, USA)

**Tableau 2.15 : Dosage d'ARN – Matériel et réactifs utilisés**

- Kit réverse transcription (Roche, Allemagne)
  - o Transcriptase réverse (RT)
  - o Tampon RT 5 x
  - o Inhibiteur de Ribonucléase
  - o dNTP mix
  - o Oligo(dT) (250 ng/μl)
  - o Eau RNase-Free
- Gants RNase-free

**Tableau 2.16 Transcription réverse– Matériel et réactifs utilisés**

Gène	Manu- facturer	Primer	Sequence	Concentr ation (nM)
<b>Ddit3</b>	IDT	F	CGTCCCTAGCTTGGCTGACA	300
		R	TCTGGAGAGCGAGGGCTTT	300
<b>HPRT1</b>	IDT	F	AAAGCCTAAGATGAGCGCAAGT	300
		R	CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA	300
<b>IL-6</b>	IDT	F	CCTAGTGCGTTATGCCTAAGCA	300
		R	TCGTAGAGAACAACATAAGCTAGATACCT	300
<b>IL-10</b>	IDT	F	AGTTCAGAGCTCCTAAGAGAGTTGTGA	300
		R	CCTCTGAGCTGCAGGAA	300
<b>ppp1r15a</b>	IDT	F	TCCTCTAAAAGCTCGAAGGT	300
		R	CAAAGCGGCTTCGATCTC	300
<b>TGFβ</b>	IDT	F	TGGAGCAACATGTGGAAGCTC	300
		R	CAGCAGCCGGTTACCAAG	300
<b>TNFα</b>	IDT	F	GAAACACAAGATGCTGGGACAGT	300
		R	CATTTCGAGGCTCCAGTGAATTC	300
<b>IL-1A</b>	IDT	F	TTGGTTAAATGACCTGCAACA	300
		R	GAGCGCTCACGAACAGTTG	300
<b>IL-1B</b>	IDT	F	TGTAATGAAAGACGGCACACC	300
		R	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG	300
<b>IFNα</b>	IDT	F	ACCCAGCAGATCCTGAACAT	300
		R	AATGAGTCTAGGAGGGTTGTATTCC	300
<b>IFNβ</b>	IDT	F	CACAGCCCTCTCCATCAACTA	300
		R	CATTTCCGAATGTTTCGTCCT	300
<b>CXCL-1</b>	IDT	F	CACCTCAAGAACATCCAGAGCTT	900
		R	GTGGCTATGACTTCGGTTTGG	300

**Tableau 2.17. RT-qPCR en temps réel - Amorces utilisées.** IDT : Integrated DNA Technologies, F : Forward, R : Reverse.

- Plaque 96 puits (Applied Biosystems, USA)
- Power SYBR Green PCR mix (Applied Biosystems, USA)
- Primers Forward et Reverse (voir tableau 17)
- cDNA rétrotranscrit à partir des extraits d'ARN (voir point 4.4.)
- 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)
- H<sub>2</sub>O

**Tableau 2.18. Real-time PCR – Matériel et réactifs utilisés**

nouvelle fois. Ensuite, 500 µl de tampon RPE sont ajoutés sur la colonne et centrifugés pendant 2 min à 8000 g. La colonne est alors placée sur un nouveau tube collecteur de 2 ml et centrifugée à 12 000 g pendant 1 min afin d'éliminer les éventuels résidus de tampon RPE. La colonne est ensuite transférée sur tube collecteur de 1,5 ml et 40 µl d'H<sub>2</sub>O RNase-free y sont ajoutés. Une centrifugation pendant 1 min à 8000 g permet d'éluer l'ARN. L'ARN ainsi obtenu peut être stocké à -70°C jusqu'à utilisation (Tableau 2.14.).

### 4.3. Dosage de l'ARN

Un volume de 1,5 µl de la suspension est prélevé pour la détermination de la concentration réalisée au NanoDrop, basée sur l'absorption des acides nucléiques dans l'UV à 260 nm. La concentration est calculée à partir de la formule :

Concentration (ng/µl) = A (absorbance) / e (coefficient d'extinction de l'ARN) (Tableau 2.15.).

### 4.4. Transcription réverse

Un volume correspondant à 2 µg d'ARN est prélevé de l'échantillon et est mélangé à 1 µl d'oligo(dT), puis porté à un volume de 13 µl avec de l'eau RNase-free. Le mélange est incubé pendant 10 min à 65 °C puis placé directement sur glace (4°C). Ensuite, on ajoute 7 µl de « master mix » comprenant 4 µl de Tampon RT (concentré 5 fois), 0,5 µl de transcriptase inverse, 0,5 µl d'inhibiteur de ribonucléase et 2 µl de dNTP mix. Ce mélange est ensuite incubé pendant 30 min à 55 °C, puis 5 min à 85 °C. A la fin de l'incubation, l'échantillon est placé sur glace et spiné 20 s. L'ADNc ainsi produit est stocké à -20 °C (Tableau 2.16.).

### 4.5. Real-time PCR

On prépare un mélange pour chaque échantillon destiné à étudier l'expression d'un gène d'intérêt, contenant par puits : 12,5 µl de SYBR Green, 2,5 µl d'eau, 2,5 µl de *primer forward* et 2,5 µl de *primer reverse* (Tableau 2.17.) et 5 µl d'ADNc dilué 100 fois. Ensuite, la plaque 96 puits est recouverte d'un film plastique, centrifugée pendant 1 min à 600 rpm et placée dans l'appareil. La PCR commence par une étape de 10 min à 95 °C permettant la dénaturation de l'ADNc, puis 40 cycles de 15 s de dénaturation à 95 °C entrecoupés de cycles de 1 min à 65 °C pour l'élongation. A la fin de la PCR, les données recueillies sont analysées par la méthode du  $\Delta\Delta C_t$  (Cycle threshold). La valeur  $C_t$  d'un gène, qui est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN initiale, est normalisée par rapport à la valeur  $C_t$  obtenue pour un gène de référence (HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*)) pour une condition donnée et correspond au  $\Delta C_t$ . On soustrait alors le  $\Delta C_t$  de la condition expérimentale par rapport à la situation contrôle, la valeur alors obtenue est le  $\Delta\Delta C_t$ . L'abondance relative du transcrit du gène de la situation d'intérêt par rapport à la condition contrôle est finalement calculée en effectuant le calcul :  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . L'expression du gène d'intérêt est alors exprimée en nombre de fois d'induction par rapport à son abondance dans la condition contrôle (Tableau 2.18.).

## 5. Immunocytochimie et observation en microscopie confocale

### 5.1. Principe

L'immunofluorescence est une technique de marquage qui permet de déterminer la localisation subcellulaire d'une protéine d'intérêt et d'estimer son abondance relative. La visualisation requiert deux anticorps : un anticorps primaire reconnaissant de manière spécifique la protéine d'intérêt et un anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome, qui reconnaît l'anticorps primaire. Suite à une excitation par un laser, le fluorochrome va émettre de la fluorescence, ce qui va permettre de localiser l'anticorps secondaire et donc la protéine d'intérêt à l'aide d'un microscope confocal.

- Boîte de culture à 12 puits (Corning, Incorporated, USA)
- Couvre-objets stériles (Karl Hecht KG, Allemagne)
- PFA (ParaFormAldehyde) à 4 %, Merck, USA)
- PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) à 2 %, PAA laboratories, USA)
- PBS-Triton-X-100 à 1 % (Sigma Aldrich, USA)
- Chambre humide
- Anticorps primaires et secondaires (voir tableau 9)
- TO-PRO 3 (Invitrogen, USA)
- Lame de microscopie (Gerhard Menzel, Allemagne)
- Mowiol (Sigma Aldrich, USA)
- Microscope confocal Leica TCS SP5 II (Leica, Belgique)

**Tableau 2.19. Immunocytochimie – Matériel et réactifs utilisés**

- Seringues (Terumo, Japon)
- Filtres 0,22µm (Sarstedt, Autriche)
- Bain-marie
- Milieu de culture :
  - Milieu DHG-L1 (Dulbecco's modified Eagle's medium + high glucose (4,5 g/l) + NaHCO<sub>3</sub> (1,5g/l))
  - Sérum de veau fœtal inactivé (SVFi) par la chaleur (Gibco, RU)

**Tableau 2.20. Préparation de milieux conditionnés – Matériel et réactifs utilisés**

## 5.2. Méthode

Les cellules sont ensemencées à une densité de 300 000 cellules par puits (RAW264.7) ou 40 000 cellules/puits (MEF) dans des boîtes de culture à 12 puits contenant des couvre-objets stériles. A 24 et 48 h PI, les cellules sont fixées pendant 15 min avec 500 µl de PFA à 4 %. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec 1 ml de PBS (RAW 264.7) ou DPBS (MEF) avant d'être perméabilisées avec 500 µl de PBS-Triton-X-100 1% pendant 5 min. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec 1 ml de PBS-ASB à 2% avant d'être incubées pendant 2 h , avec l'anticorps primaire à la bonne dilution préparé dans du PBS-ASB à 2%, dans une atmosphère humide et à température ambiante. Après incubation, les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS-ASB 2 % et sont ensuite incubées pendant 1 h (dans une atmosphère humide, à température ambiante et à l'obscurité) avec l'anticorps secondaire dilué (voir Tableau 2.12.). Au terme de l'incubation, les cellules sont encore rincées une fois avec 1 ml de PBS-ASB à 2 %.

Pour le marquage des noyaux, les cellules sont incubées 30 min avec du TO-PRO 3 dilué 80 fois dans du PBS contenant 2 % de RNase. Les cellules sont rincées une fois avec 1 ml de PBS et ensuite montées sur des lames de microscopie avec du Mowiol. Finalement les lames sont analysées au microscope confocal à fluorescence (Tableau 2.19.).

## 6. Préparation et utilisation de milieux conditionnés

### 6.1. Principe

Le terme milieu de culture conditionné désigne un milieu de culture dans lequel des cellules ont déjà été cultivées pendant une certaine période. Ce milieu contient donc des molécules biologiques secrétées (protéines, ARN, lipides) par les cellules cultivées. Cependant, les nutriments et facteurs de croissance initialement présents dans le milieu frais ont été en partie consommés par les cellules lors de leur croissance. De même, le métabolisme cellulaire produit des déchets qui seront également retrouvés dans des milieux conditionnés.

Ces milieux peuvent être utilisés pour cultiver d'autres cellules du même type ou d'un type différent (cellules naïves) afin de rechercher l'effet biologique des molécules solubles présentes dans ces milieux ou encore être utilisés directement pour doser certaines molécules comme des cytokines.

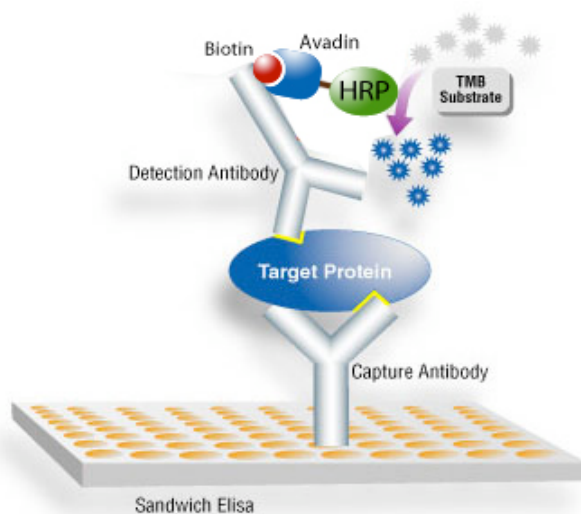
### 6.2. Méthode

Les cellules sont repiquées à en boites de culture 6 puits à une densité de 600000 cellules par puits et infectées selon la procédure décrite au point 2.1. Les milieux conditionnés sont prélevés à 33 h post-infection (car l'abondance de CHOP10 augmente entre 24 et 48 h PI, ce qui suggère que les médiateurs solubles potentiellement responsables de sa production sont présents dans le milieu entre ces deux temps) (Tableau 2.20.).

## 7. Incubation des cellules naïves avec les milieux conditionnés

Les milieux de culture conditionnés de plusieurs puits sont regroupés. Ensuite, ils sont tout d'abord filtrés à l'aide d'un filtre 0,22 µm, puis, en fonction de l'expérience, incubés ou non à 80 °C pendant 15 min pour dénaturer les protéines. Enfin, ces milieux vont être dilués deux fois dans du DHG-L1 + 10 % SVFi, et ce afin de fournir des éléments nécessaires à la survie des cellules naïves incubées avec le milieu conditionné.

Les cellules naïves ensemencées en boîtes de culture 6 puits à une densité de 600 000 cellules par puits. Le lendemain, les milieux conditionnés sont testés sur les cellules naïves et sont remplacés toutes les 24 h. Au terme de 24 ou de 48 h d'incubation avec les milieux de culture conditionnés, l'ARN total des cellules naïves est extrait et l'expression du gène *Ddit3* sera analysée par RT-qPCR en temps réel comme expliqué au point 4 du matériel et méthodes.



**Figure 2.7. ELISA : principe : Schéma représentant le principe d'un ELISA « en sandwich »**

La manipulation se réalise dans une plaque 96 puits dont les puits sont tapissés avec un anticorps de capture spécifique de l'antigène que l'on souhaite étudier. Une fois retenu par l'anticorps de capture, l'antigène pourra être reconnu par l'anticorps de détection. Ce dernier est couplé/conjugué à de la biotine pour fixer la peroxydase couplée à l'avidine. Le substrat de cette enzyme, est ensuite ajouté pendant une durée déterminée permettant la réaction de révélation. L'abondance du produit de réaction catalysée par l'enzyme, un composé chromogène, sera directement proportionnelle à l'abondance de l'antigène dans l'échantillon de départ.

(Modifié de <http://www.microscopesblog.com/2009/08/elisa.html> - visité de 25 octobre 2011)

- Solution A
  - o 1 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 2 % (Merck, Allemagne)
  - o 10  $\mu\text{l}$  de Tatratre de Na et K à 2 % (Merck, Allemagne)
  - o 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{CuSO}_4$  à 1 % (UCB, Belgique)
- Réactif de Folin (Merck, Allemagne)
- NaOH 1 N (Merck, Allemagne)
- ABS (2 mg/ml) (Thermo Scientifique, USA)

**Tableau 2.21. Folin – Matériel et réactifs utilisés**

## **8. Dosage des cytokines dans les milieux conditionnés par la technique Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)**

### **8.1. Principe**

Le test ELISA repose sur une technique basée sur l'immunologie qui permet de déterminer l'abondance/concentration relative (ou la concentration absolue par référence à une courbe de calibration/d'étalonnage) d'un antigène dans une solution. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons réalisé un ELISA dit « en sandwich » dans le but de déterminer l'abondance de plusieurs cytokines présentes dans des milieux de culture conditionnés de macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*.

Ce test est réalisé dans une plaque 96 puits dont les puits sont tapissés avec un anticorps de capture spécifique à l'antigène que l'on souhaite étudier. Une fois retenu par l'anticorps de capture et après des rinçages, l'antigène sera reconnu par un anticorps de détection. Ce dernier est conjugué à de la biotine et pourra lui-même se lier à une enzyme de révélation comme la peroxydase couplée à l'avidine. Le substrat de cette enzyme est ensuite ajouté et au terme d'un temps d'incubation déterminé, l'abondance du produit de la réaction catalysée par l'enzyme, un composé chromogène, sera déterminée par une mesure de l'absorbance à une longueur d'onde propre à ce composé et ce, à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance qui est lue, pour autant qu'on reste dans la zone de linéarité du test, sera directement proportionnelle à l'abondance/concentration de l'antigène dans l'échantillon de départ (Figure 2.7.). Les valeurs obtenues pour l'abondance des différentes cytokines à l'aide de ce test ELISA seront ensuite normalisées par la quantité de protéines associées au tapis cellulaire correspondant, qui sera déterminée par la méthode de Folin.

### **8.2. Méthode**

#### **a. Dosage des protéines par la méthode de Folin**

A 5, 20 et 44 h PI, les milieux conditionnés de macrophages RAW264.7 infectés par *B. abortus* sont prélevés, filtrés à l'aide d'un filtre 0,22 µm et stockés à -70 °C.

Une fois les milieux de culture conditionnés prélevés, les tapis cellulaires ont été rincés 2 fois avec 2 ml de PBS, puis hydrolysés pendant 30 min dans 800 µl de NaOH à 0,5 N et stockés à -20 °C en attendant le dosage.

L'expérience est réalisée en plaque 96 puits. Premièrement, l'ASB est hydrolysé dans du NaOH à 0,5 N pour obtenir des solutions de concentrations croissantes (100 ; 200 et 400 µg/ml) en ASB et ce, afin de réaliser une droite d'étalonnage. Ensuite, 20 µl de chaque hydrolysate sera dilué 4 fois dans du NaOH (0,5 N) dans un volume final de 80 µl et 30 µl de cette dilution seront placés dans un puits. Les blancs seront constitués en remplaçant les 30 µl d'échantillon par 30 µl de NaOH à 0,5 N.

Ensuite, 150 µl de solution A (Tableau 2.21.) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite placée sur un agitateur rotatif (500 rpm) pendant 10 min. Au terme de cette incubation, 15 µl de réactif de Folin dilué 2 fois dans de l'H<sub>2</sub>O distillée sont ajoutés dans chaque puits. La réaction se déroule d'abord à température ambiante sous agitation rotative (500 rpm) pendant 5 min puis à température ambiante pendant 30 min sans agitation. L'absorbance du produit de réaction est ensuite déterminée à 740 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

#### **b. ELISA**

Un ensemble de 12 cytokines ont été quantifiées dans les milieux de culture conditionnés de cellules RAW264.7 infectées et ce, à différents temps PI (5, 20 ou 44 h) ou des cellules non infectées (contrôles) incubées pendant des temps équivalents, à l'aide d'un



		Cytokines											
		IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	IL-12	IL-23	IFN $\gamma$	TNF $\alpha$	MCP-1	GM-CSF	MIP-1a	MIP-1b
Echantillons	Contrôle négatif												
	5 h Contrôle												
	5h Infecté												
	20 h Contrôle												
	20 h Infecté												
	44 h Contrôle												
	44 h Infecté												
	Contrôle positif												

**Figure 2.8. Design de la plaque ELISA pour la quantification des cytokines présentes dans les milieux de culture conditionnés de cellules RAW264.7 infectées par *B. abortus*.**

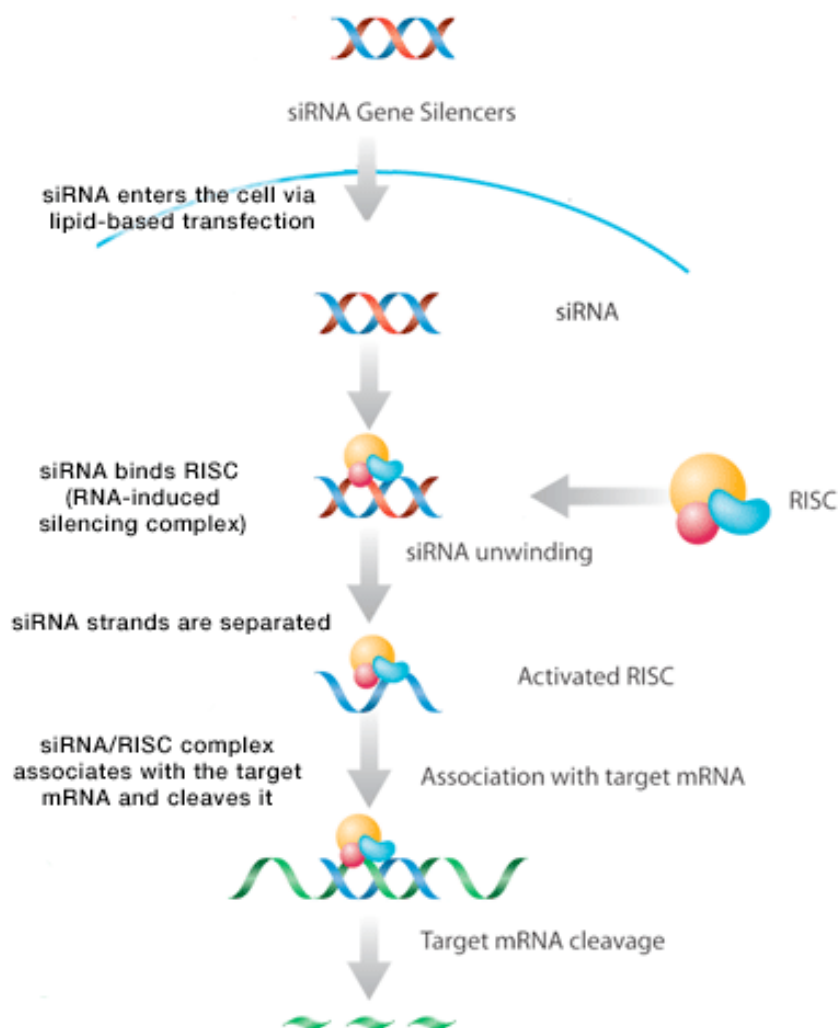
L'abondance d'un ensemble de 12 cytokines a été quantifiée à l'aide d'un kit ELISA multi-analyses (SaBiosciences). Ce kit contient une plaque 96 puits divisée en 12 strips de 8 puits tapissés avec des anticorps de capture spécifiques à une cytokine d'intérêt. Ce test permet donc l'analyse de 6 échantillons différents puisque deux rangées de puits sont réservées aux contrôles positif et négatif.

**Kit Multianalyte ELISArray (SA Biosciences, Allemagne)**

- Plaque 96 puits tapissés avec des anticorps de capture
- Antigènes standards pour chaque cytokine étudiée (1  $\mu$ g/ml)
- Anticorps de détection
- Conjugué Avidine-HRP
- ABS (10 %)
- Sérum d'âne
- Strip de tubes pour diluer les anticorps de détection
- Tampon de dilution des échantillons
- Tampon d'analyse
- Tampon de rinçage
- Solution de développement
- Solution Stop

**Tableau 2.22. ELISA – Matériel et réactifs utilisés**





**Figure 2.9. Transfection de cellules RAW264.7 avec des siRNA – Principe**

Les siRNA sont des ARN double brins, de 20 – 25 nucléotides, qui vont être pris en charge par le complexe protéique RISC. Ce complexe va dissocier les deux brins du duplexe siRNA et, après hybridation à la séquence complémentaire de l'ARNm cible, assurera la dégradation des ARNm complémentaires au siRNA par un clivage endoribonucléique dans l'hétéro-duplex formé d'un des brins du siRNA et de l'ARNm ([http://www.scbt.com/gene\\_silencers.html](http://www.scbt.com/gene_silencers.html) - visité le 1 novembre 2011)

- Boîte de culture à 12 puits
- Milieu de culture :
  - o Milieu DHG-L1 (Dulbecco's modified Eagle's medium + high glucose (4,5 g/l) + NaHCO<sub>3</sub> (1,5g/l)) (Gibco, RU)
  - o Sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVFi) (Gibco, RU)
- Tampon siRNA 5X (Thermo Scientific, USA)
- siRNA CHOP10 – ON-TARGETplus smart pool (Dharmacon, Thermo Scientific, USA)
- siRNA « RISC-Free » (Dharmacon, Thermo Scientific, USA)
- H<sub>2</sub>O stérile

**Tableau 2.23. Transfection siRNA – Matériel et réactifs**

kit ELISA multi-analyses (Figure 2.8.). Les échantillons testés sont donc des milieux de culture conditionnés de cellules RAW264.7 préparés selon le protocole décrit au point 6.

Ce kit contient une plaque 96 puits divisée en 12 strips de 8 puits tapissés par des anticorps de capture spécifiques à chaque cytokine d'intérêt. Ce test permet l'analyse de 6 échantillons puisque deux rangées de puits sont réservés aux contrôles positif (cytokine recombinante testée) et négatif (DHG-L1 + SVFi) (Figure 2.8.). Le kit comprend également l'ensemble des anticorps de détection, des standards constitués des cytokines recombinantes (contrôles positifs) ainsi que l'ensemble des réactifs nécessaires à la détection colorimétrique des cytokines (Tableau 2.22.).

Le test a été réalisé conformément aux instructions fournies avec le kit. Premièrement, 50 µl de milieu conditionné (condition test), de DHG-L1+10 % SVFi (contrôle négatif) ou de solution contenant la cytokine recombinante (contrôle positif) sont ajoutés aux 50 µl de tampon d'analyse préalablement placés dans la plaque 96 puits. Au terme de 2 h d'induction, la plaque 96 puits est rincée trois fois à l'aide du tampon prévu à cette effet. Deuxièmement, 100 µl de la solution contenant les anticorps de détection sont ajoutés dans les puits. Au bout d'1 h, la plaque est rincée 3 fois avec le tampon prévu à cet effet. Troisièmement, 100 µl de solution contenant l'avidine couplée à l'HRP vont être ajoutés et incubés pendant 30 min.

Les dernières étapes consistent à révéler la présence de l'HRP et donc de l'antigène analysé. Pour cela, 100 µl de solution de développement (contenant le substrat de l'HRP) sont ajoutés dans les puits et la plaque est incubée 15 minutes à l'obscurité. Au terme de ces 15 minutes, 100 µl de solution STOP sont ajoutés dans les puits afin de mettre à la réaction catalysée par l'HRP. L'absorbance à 450 et 570 nm des solutions de trouvant dans les différents puits est lue à l'aide d'un spectrophotomètre dans les 30 min suivant l'ajout de la solution STOP. Les valeurs de DO obtenues à 570 nm sont soustraites des valeurs obtenues à 450 afin de corriger l'erreur qui serait due à des défauts du plastique de la plaque 96 puits.

Les résultats du dosage de cytokines dans les milieux de culture conditionnés sont normalisés par le contenu en protéines des tapis cellulaires correspondants et donc exprimés en unités de D.O. (obtenues lors de l'ELISA) par mg de protéines du tapis cellulaire.

## **9. Transfection des cellules RAW264.7 avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de CHOP10**

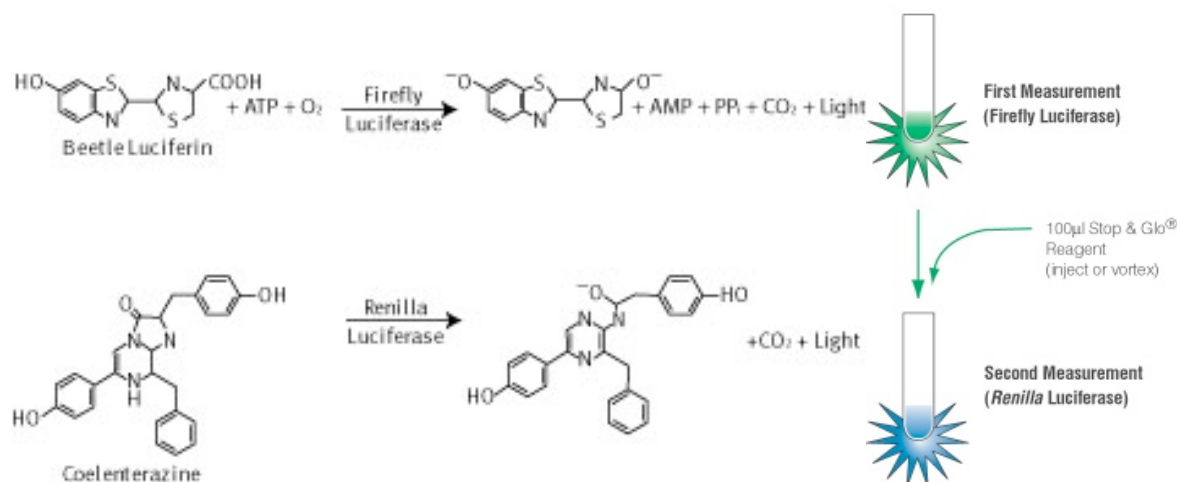
### **9. 1. Principe**

La transfection consiste à introduire du matériel étranger (acides nucléiques ou protéines) à l'intérieur d'une cellule. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons utilisé une méthode de transfection chimique pour transfecter les cellules RAW264.7 avec des siRNA (*small interfering RNA*). Cette approche par ARN interférents permet le silençage (*knock down*) spécifique de l'expression d'un gène donné et constitue donc un niveau post-transcriptionnel de la régulation de l'expression génique<sup>185</sup>. L'agent de transfection utilisé est le HiPerFect (Qiagen), un mélange de peptides neutres et cationiques qui seront responsables de la neutralisation des charges négatives des siRNA et donc permettront leur internalisation grâce à l'interaction des domaines hydrophobes des lipides avec la membrane plasmique. Les siRNA sont des ARNs double brins de 20 – 25 nucléotides qui, seront pris en charge par le complexe protéique RISC (*RNA Inducing Silencing Complex*). Celui-ci, par l'intermédiaire des protéines Argonautes, va induire la dégradation des ARNm complémentaires hybridés au siRNA<sup>186</sup>. Le clivage endoribonucléique dans la région de l'appariement signifie que les ARNm cibles ne pourront plus être traduits en protéines (Figure 2.9.).

La transfection des cellules avec un siRNA permet donc d'inhiber spécifiquement l'expression d'un gène donné codant pour une protéine d'intérêt.

Plasmides	
Plasmide rapporteur	pGL3-ATF6a- Luc (Professeur Shyy, USA)
Plasmide vide	pGL3 -basic
Plasmide d'expression	pRL-SV40

**Tableau 2.24. Plasmides utilisés pour la transfection des cellules RAW264.7** avec le plasmide contenant le gène rapporteur luciférase (*Firefly*, FF) placé sous le contrôle d'un promoteur sensible au facteur de transcription ATF6. Le plasmide d'expression de la luciférase de *Renilla* contient un gène placé sous contrôle d'un promoteur constitutif SV-40 et est utilisé pour la normalisation des résultats d'activité luciférase (FF) par l'efficacité de transfection.



**Figure 2.10. Principe et étapes du test « Dual luciférase ».**

Le premier tampon LARII contient, de la luciférine, le substrat qui permet à la luciférase *Firefly* d'émettre de la luminescence, alors que le tampon « Stop and Glo » permet d'inhiber la réaction de la luciférase *Firefly*, et active la réaction catalysée par la luciférase *Renilla*, grâce à la présence de coelenterazine. Le ratio entre l'activité de la luciférase de *Firefly* par rapport à l'activité luciférase de *Renilla* est ensuite calculé. Cette normalisation permet donc de corriger les valeurs pour l'efficacité de la transfection dans les différentes conditions expérimentales (Manuel d'utilisation du kit Dual luciférase, Promega).

- Plasmides contenant un gène rapporteur luciférase et plasmide d'expression (voir tableau 27)
- Fugène HD (Roche, Allemagne)
- Opti-MEM (Invitrogen, USA)
- DHG-L1 + SVFi à 10 %
- Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, USA)
  - Luciferase assay substrate
  - Passive lysis Buffer 5x
  - Luciferase assay Buffer 2
  - Stop and Glo substrate
  - Stop and Glo buffer
- Luminomètre (FB 12, Allemagne)

**Tableau 2.25. Transfection des cellules RAW264.7 avec les plasmides rapporteur et d'expression de la luciférase – Matériel et réactifs utilisés.**

## 9.2. Méthode

Les cellules RAW264.7 sont repiquées dans des boîtes de culture à 12 puits à la densité de 50000 cellules/puits dans 1 ml de milieu DHG-L1 + 10 % SVFi pendant 24 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Ensuite, les milieux sont décantés et remplacés par 200 µl DHG-L1 contenant 10 % SVFi. Des solutions de transfection contenant 10 µl d'HiPerFect, 200 µl de DHG-L1 et 750 ng de siRNA (ON-TARGETplus smart pool) contre l'ARNm de CHOP10 ou de siRNA « RISC Free » (utilisés comme contrôles) sont préparées. Les complexes (siRNA-agent de transfection) sont formés au cours d'une incubation de 10 min à température ambiante. Les solutions sont ensuite ajoutées aux 200 µl de milieu qui couvre les cellules. Pour les conditions correspondant aux cellules non transfectées, on ajoute seulement 200 µl de DHG-L1 au milieu qui couvrent les cellules. Les cellules sont ensuite incubées pendant 6 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Au terme de cette incubation, un volume de 800 µl de DHG-L1 contenant 10 % SVFi est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont ensuite à nouveau incubées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 h d'être infectées par *B. abortus* (voir point 2.1) (Tableau 2.23.).

## 10. Transfection des cellules RAW264.7 avec des plasmides rapporteurs-luciférase

### 10.1. Principe

Comme mentionné au point précédent, la transfection consiste en l'introduction de matériel génétique à l'intérieur des cellules. Dans le but de caractériser l'état d'activité d'un facteur de transcription, les systèmes rapporteurs sont couramment utilisés car ils donnent une réponse globale sur l'activité trans-activatrice du facteur étudié. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'activité du facteur de transcription ATF-6. Nous avons donc co-transfecté des cellules RAW 264.7 avec un plasmide rapporteur (pGL3-ATF6a- Luc) contenant le gène de la luciférase *firefly* placé sous le contrôle du promoteur d'un gène d'intérêt (ici ATF6), et un plasmide d'expression contenant le gène de la luciférase *renilla* placé sous le contrôle d'un promoteur viral (SV40 : Simian Virus - 40) constitutif et fort. La quantité de luciférase *Firefly* sera donc proportionnelle au taux de transcription du gène rapporteur placé sous contrôle d'un promoteur sensible à ATF6, et donc à l'activité de ce facteur. Par contre, l'activité de la luciférase *Renilla* sera directement proportionnelle au nombre de cellules transfectées et donc à l'efficacité de la transfection. La normalisation des valeurs obtenues pour l'activité luciférase *Firefly* par l'activité de l'enzyme *Renilla* permettra donc de tenir compte et de corriger ce facteur important qui pourrait varier entre les différentes conditions expérimentales (Manuel du kit).

### 10.2. Méthode

Les cellules RAW264.7 sont repiquées dans des boîtes de culture à 12 puits à une densité de 200000 cellules/puits et incubées pendant 24 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Le lendemain, les cellules sont transfectées. La solution de transfection contenant les complexes ADN-agent de transfection est préparée et contient un équivalent, par puits de cellules à transfecter, 100 µl de milieu de culture Opti-MEM, 2 µg d'ADN (0,2 µg de plasmide d'expression et 1,8 µg de plasmide rapporteur ou de plasmide vide (Tableau 2.24.) et 6 µl d'agent de transfection (Fugene HD). Les complexes sont formés au cours d'une incubation de 10 min à température ambiante puis placées sur les cellules.



Les cellules sont transfectées pendant 24 h avant d'être mises au repos pendant 4 h dans 1 ml de DHG-L1 + 10 % SVFi frais. Au terme de ces incubations, les cellules sont exposées pendant 1 h à la suspension de *B. abortus* pour l'infection.

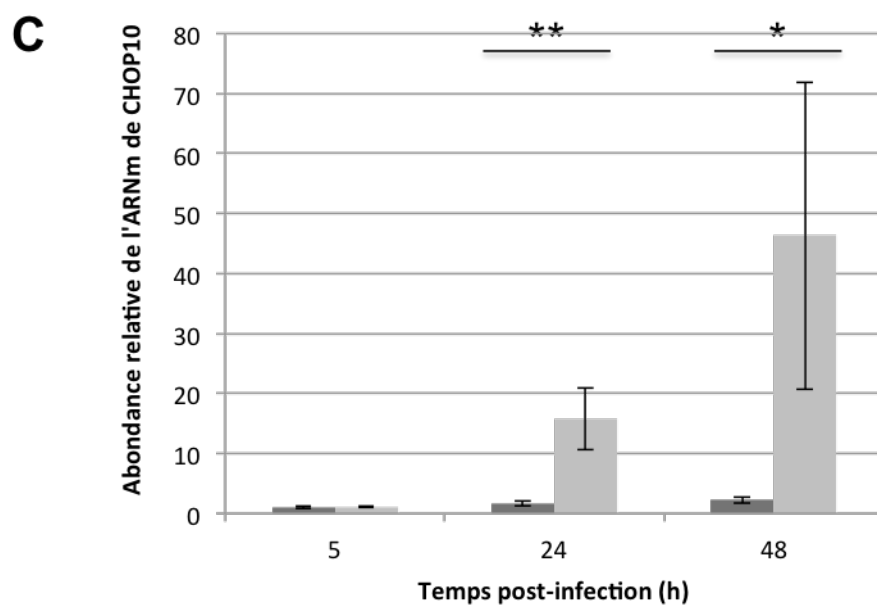
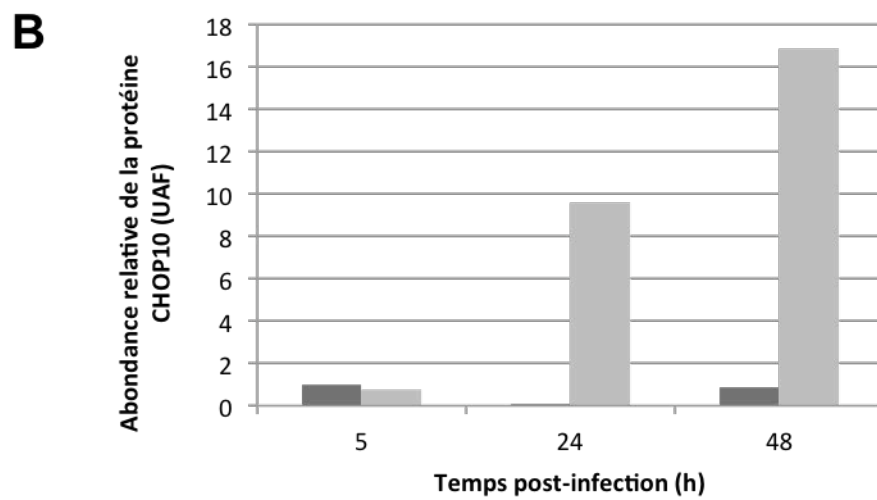
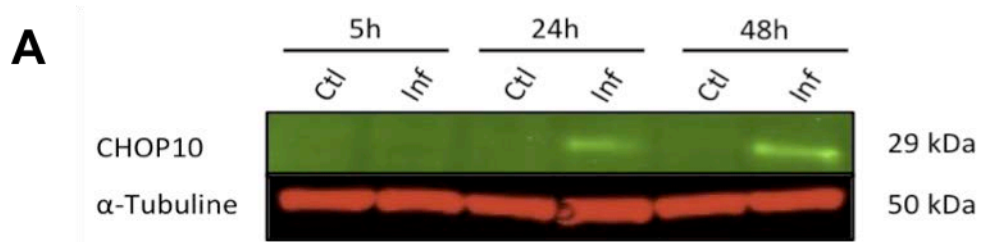
Au terme de ces traitements, les activités luciférase (*Firefly* et *Renilla*) sont dosées à l'aide du kit « Dual Luciferase Reporter Assay System ». A 24 et 48 h p.i., les cellules sont rincées dans 1 ml de PBS et lysées dans 250 µl de PLB (Passive Lysis Buffer) pendant 15 min à température ambiante. Les lysats sont filtrés à l'aide d'un filtre de 0,22 µm afin de pouvoir sortir du BL3. Pour le dosage des activités enzymatiques, 10 µl du lysat sont ajoutés à 60 µl de LAR II (Luciferase Assay Buffer II) et la luminescence est mesurée dans un luminomètre (Luciférase *Firefly*). Directement après la mesure, 60 µl de réactif « Stop and Glo » sont ajoutés et la luminescence est également mesurée (Luciférase *Renilla*) (Figure 1.10.). Les résultats sont ensuite exprimés comme le ratio (activité *Firefly*/activité *Renilla*) en RLU (Relative Light Unit) (Tableau 2.25.).











**Figure 3.1. Effet de l'exposition à *B. abortus* sur l'abondance relative de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7.**

**A. et B.** Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées (Inf, colonnes gris clair) ou non (Ctl, colonnes gris foncé) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 + 10 % SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 5, 24 et 48 h PI, des lysats cellulaires clairs ont été préparés. Leur concentration protéique a été déterminée par la méthode de Pierce et une quantité de 20 µg de protéines a été chargée sur gel Nu-PAGE 10 %. Les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse et transférées sur une membrane PVDF (A). L'abondance des protéines d'intérêt a été analysée par Western blotting avec des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes CHOP10 (IgG de souris) et tubuline- $\alpha$  (IgG de souris), ensuite reconnus par des anticorps secondaires, IgG de chèvre dirigés contre des anticorps de souris (IRDYE 800 nm) pour CHOP10 et (IRDYE 680 nm) pour la tubuline- $\alpha$ . L'intensité du signal de fluorescence associé aux bandes des protéines d'intérêt a été quantifiée avec le programme « Odyssey Infrared Imaging System » et l'abondance protéique a été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline- $\alpha$  (B). L'immuno-détection de cette protéine a été utilisée pour contrôler la charge protéique. Les résultats sont donc exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UAF) normalisée par rapport à la tubuline- $\alpha$  (n=1).

**C.** Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées (colonnes gris clair) ou non (colonnes gris foncé) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 + 10 % SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 5, 24 et 48 h PI, l'ARN total a été extrait et 5 µg d'ARN ont été utilisés pour générer de l'ADNc par transcription inverse. L'abondance des transcrits a été mesurée par RT-qPCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les ratios d'expression ont été calculés sur base de la méthode  $\Delta\Delta C_t$  avec HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*) utilisé comme gène de référence. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'induction par rapport à l'abondance de l'ARNm de *Ddit3* dans des extraits de cellules contrôles (préparés au temps 0 h). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes  $\pm$  1 écart type pour n=3. L'analyse statistique des différences observées entre les cellules contrôles et les cellules exposées à la bactérie a été établie par un test t de Student (\*, \*\*: significativement différent du contrôle correspondant avec, respectivement : P<0,05, P<0,01).

### **Partie 1 : Caractérisation de l'expression de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *Brucella*.**

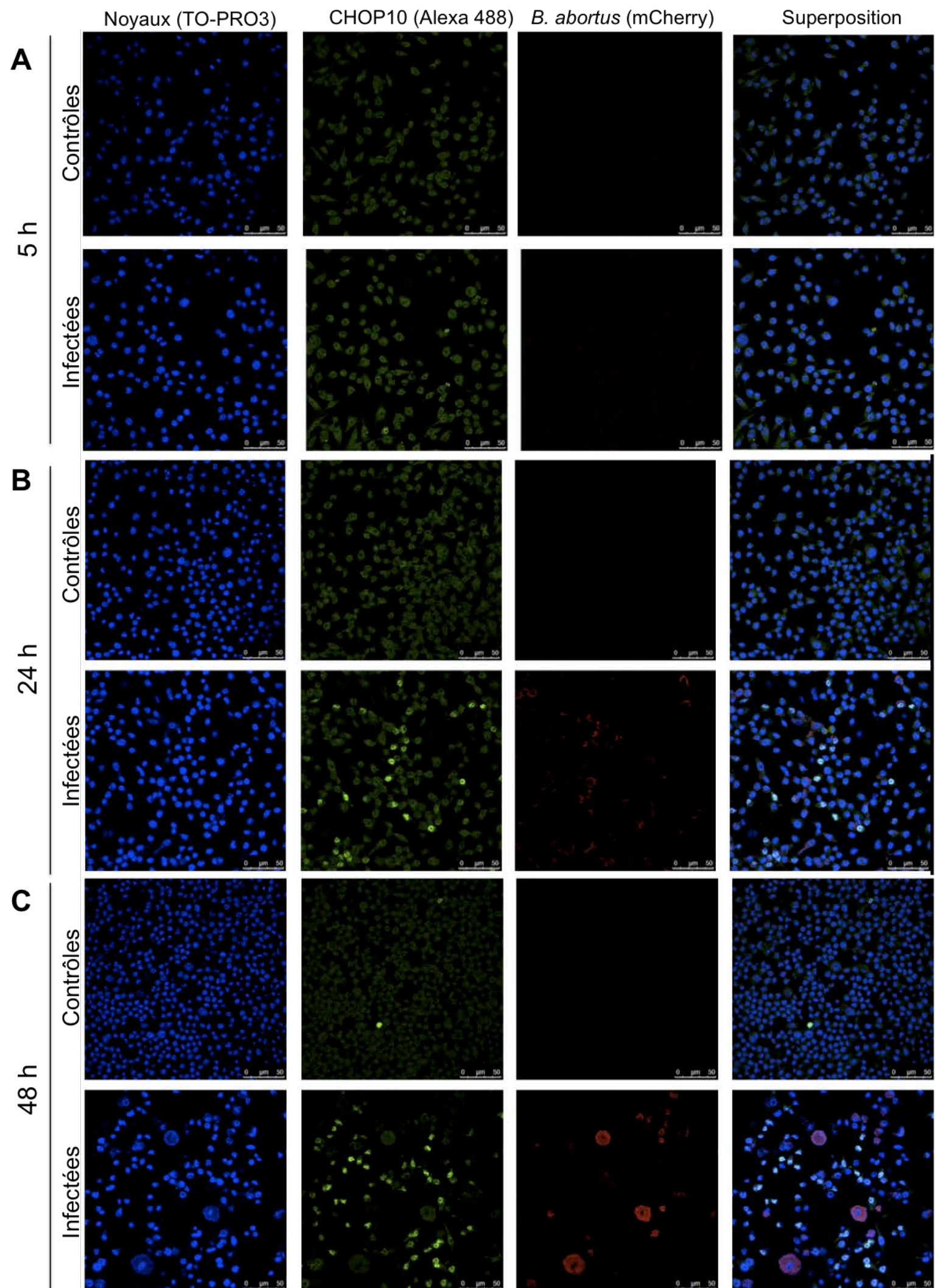
#### **1.1. Abondance de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposées à *B. abortus***

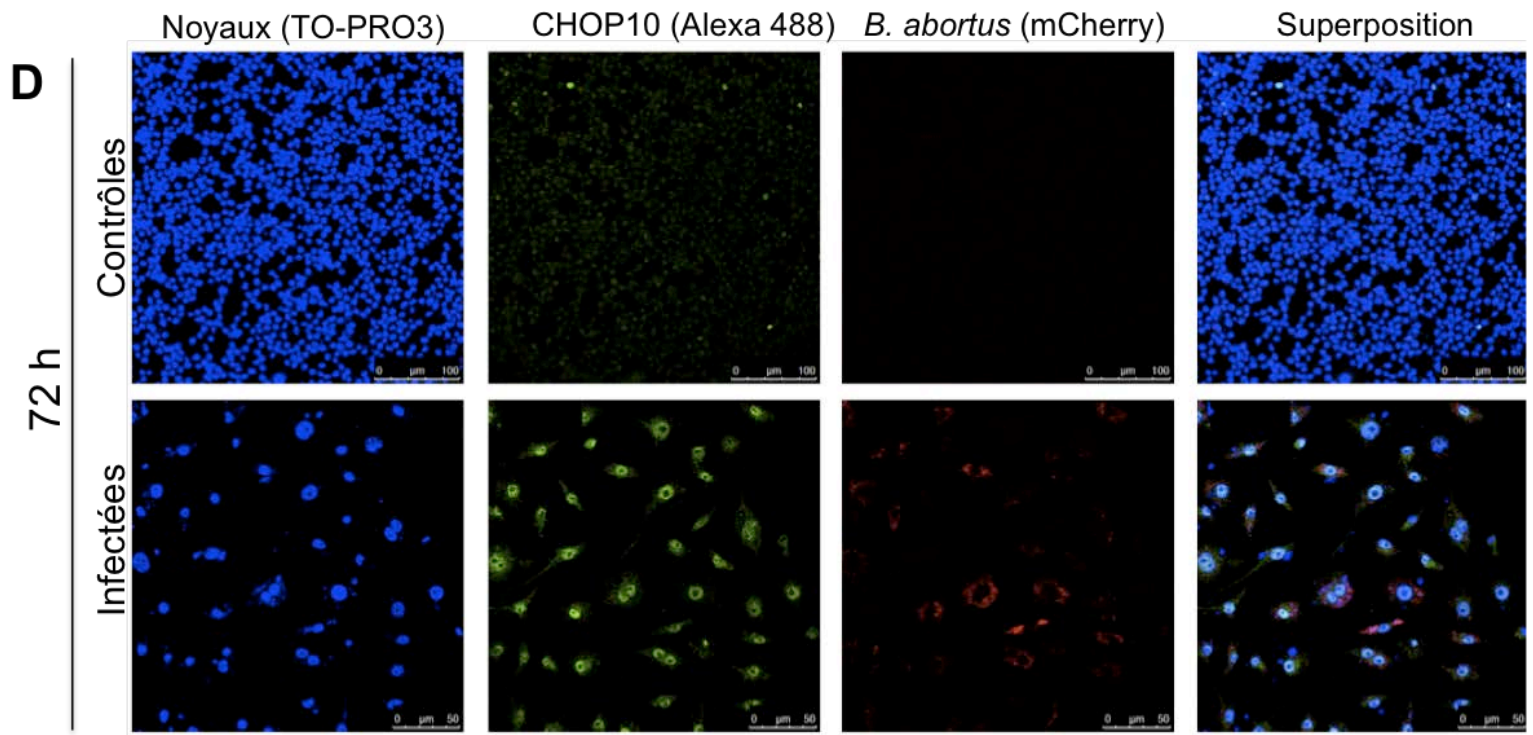
Comme mentionné dans l'introduction, une étude réalisée précédemment au laboratoire suggère qu'une exposition des macrophages RAW264.7 à *B. abortus* induit une augmentation de l'abondance protéique de CHOP10 dans les cellules (Nicolas Lebailly, Mémoire 2011) mais le(s) mécanisme(s) conduisant à cette induction et le rôle joué par CHOP10 dans ces conditions sont totalement inconnus, ce qui justifie pleinement la poursuite de cette étude.

Dans un premier temps, nous avons tout d'abord voulu confirmer ces observations préliminaires. Nous avons donc recherché l'abondance de la protéine CHOP10 par une analyse en Western blot en fluorescence réalisée sur des lysats totaux de cellules RAW264.7 infectées/exposées à *B. abortus* et ce, 5, 24 et 48 h PI. Des cellules non infectées mais incubées pendant les mêmes temps dans du milieu de culture DHG-L1 + 10 % de SVFi constituent les cellules contrôles (Figure 3.1. A et B). Sur cette figure, on observe que la protéine CHOP10 est peu (ou pas) détectée dans les cellules contrôles et ce, quelque soit le temps considéré. De plus, aucune détection n'a pu être mise en évidence pour un temps de 5 h PI. Par contre, dans les cellules exposées à la bactérie, on observe bien une augmentation modérée de l'abondance de CHOP10 à 24 h PI (9 fois) et une augmentation encore plus importante à 48 h PI (17 fois). De plus, nous avons confirmé des éléments de la littérature qui rapportent que CHOP10 est très faiblement exprimé en conditions basales<sup>123</sup>, puisque nous ne détectons que très difficilement la présence de la protéine dans les conditions contrôles et ce, quel que soit le temps testé (Figure 3.1. B). Nous avons donc bien confirmé les résultats obtenus précédemment (Nicolas Lebailly, Mémoire 2011).

Dans un deuxième temps, nous avons voulu déterminer si l'augmentation de l'abondance protéique de CHOP10 était due à une stabilisation de la protéine ou à une véritable augmentation de la transcription de *Ddit3*, le gène encodant CHOP10. Pour cela, nous avons déterminé l'abondance relative des ARNm de CHOP10 en RT-qPCR en temps réel à partir d'ARN total extrait de cellules non infectées (contrôles) ou infectées/exposées à *B. abortus* et ce pour des temps de 5, 24 et 48 h PI (Figure 3.1. C). On observe également une augmentation de l'abondance du transcrit du gène *Ddit3* à 24 et 48 h PI, et l'abondance relative du transcrit du gène est plus importante à 48 h qu'à 24 h PI (45 et 15 fois, respectivement).

Etant donné que l'augmentation d'abondance protéique est corrélée à une augmentation de l'abondance de l'ARNm, il semble que l'augmentation de l'abondance protéique soit bien le résultat d'une augmentation de la transcription du gène *Ddit3* (ou d'une stabilisation de l'ARNm de CHOP10). Puisque que nous avons montré que lors de l'induction du gène codant pour CHOP10 dans les macrophages exposés à la bactérie, l'abondance protéique peut être directement corrélée à l'abondance du transcrit, l'évaluation de l'expression de CHOP10 sera, dans la suite des expériences réalisées dans ce travail, réalisée au niveau de l'ARNm.





**Figure 3.2. Marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale de la localisation de CHOP10 dans des macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*.**

Des macrophages RAW264.7 ont étéensemencés sur des couvre-objets stériles dans des boîtes de culture à 12 puits à une densité de 300 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées ou non à *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 + 10 % SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A différents temps post-infection (PI), 5 (A), 24 (B), 48 (C) et 72 h (D), les cellules ont été fixées par du PFA à 4 %. Elles ont ensuite été perméabilisées à l'aide de PBS + Triton X-100 à 1 % et marquées avec un anticorps dirigé contre CHOP10, lui-même révélé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (ALEXA 488). Les noyaux ont également été marqués au TO-PRO3.

Les micrographies ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal (Leica) aux longueurs d'ondes suivantes : Ex.  $\lambda$  = 488 nm; Em.  $\lambda$  = 500 - 535 nm (CHOP10 (Alexa 488)); Ex.  $\lambda$  = 543 nm, Em.  $\lambda$  = 555 - 620 nm (*B. abortus* (mCherry)); Ex.  $\lambda$  = 633 nm, Em.  $\lambda$  = 650 - 750 nm (Noyaux (TO-PRO3)).





## 1.2. Localisation subcellulaire de CHOP10 et homogénéité de la réponse d'induction du gène *Ddit3*.

Etant donné que CHOP10 est un facteur de transcription, sa localisation et son activité trans-activatrice sont attendues dans le noyau des cellules RAW264.7 infectées par *B. abortus*. En effet, bien que CHOP puisse permettre la régulation transcriptionnelle de gènes cibles d'autres voies de signalisation en interagissant, parfois dans le cytosol, avec des facteurs de transcription tels que TCF<sup>128</sup> ou AP-1<sup>127</sup>, son activité de facteur de transcription doit dépendre d'une liaison à l'ADN.

Nous avons donc réalisé un marquage en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale de la protéine CHOP10 dans des cellules RAW264.7 exposées ou non à *B. abortus*. L'observation des bactéries utilisées pour l'infection dans ces conditions est aisée puisque nous avons utilisé une souche mutante de la *B. abortus* 2308 qui exprime constitutivement la protéine fluorescente mCherry. Cette expérience avait deux objectifs principaux: déterminer la localisation subcellulaire de la protéine et estimer le degré d'homogénéité (ou d'hétérogénéité) de la réponse conduisant à l'induction du gène *Ddit3* au sein de la population des macrophages RAW 264.7 ayant été en contact avec la bactérie.

Nous avons donc observé des cellules RAW264.7 exposées ou non à la bactérie, après 5, 24, 48 ou 72 h PI puis marquées pour la protéine CHOP10 (Figure 3.2. A-D). Premièrement, nous pouvons observer sur ces micrographies que le signal de fluorescence correspondant à CHOP10 n'est pas (peu) détecté dans les cellules (contrôles) non exposées à *B. abortus* et ce, quelque soit le temps étudié (Figure 3.2. A - D). Deuxièmement, la protéine CHOP10 est également peu détectée dans des cellules exposées à *Brucella* et analysées à 5 h PI (Figure 3.2. A). Ce résultat est en parfait accord avec les résultats obtenus en Western blot (Figure 3.1.). Troisièmement, aux temps plus tardifs, CHOP10 est bien détecté dans le noyau des cellules. Il est intéressant et important de remarquer que CHOP10 est tout d'abord exclusivement détecté dans le noyau des cellules exposées à la bactérie mais non infectées (24 et 48 h PI, (Figures 3.2. B et C) puis, plus tardivement, également dans le noyau de toutes les cellules, qu'elles contiennent ou non les bactéries (72 h PI, Figure 3.2. D).

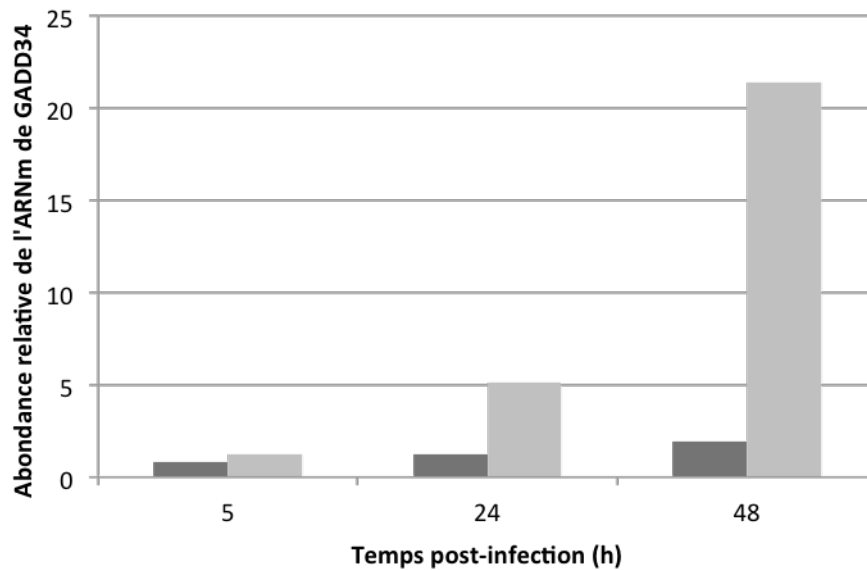
Nous avons bien évidemment réalisé des contrôles négatifs réalisés sans anticorps primaires ou sans anticorps secondaire afin de vérifier la spécificité du marquage réalisé. Dans ces conditions, aucun marquage n'a été observé (données non montrées).

Le facteur de transcription CHOP10 est donc exprimé initialement dans des cellules qui ne contiennent pas de bactéries. A ce stade, au moins deux hypothèses peuvent être proposées pour tenter d'expliquer le mécanisme de l'induction de *Ddit3* dans les macrophages en réponse à un contact avec *B. abortus*. Premièrement, l'expression de *Ddit3* pourrait survenir tardivement (car le LPS de *B. abortus* est peu endotoxique) dans les cellules suite à un contact entre la bactérie et la cellule eucaryote. Ce processus ne nécessiterait donc pas d'internalisation de la bactérie (hypothèse du contact).

Dans une deuxième hypothèse, l'entrée de la bactérie dans certaines cellules induirait une voie de signalisation conduisant à la production de médiateurs solubles libérés dans le milieu extracellulaire (de nature cytokinique ou non) permettant d'induire l'expression de *Ddit3* dans des cellules voisines qui ne contiennent pas la bactérie (hypothèse de la communication inter-cellulaire).

Dans ces deux modèles, il faut également découvrir un processus par lequel *Brucella* inhiberait, transitoirement, l'expression de CHOP10 dans les cellules qui la contiennent et ce, au moins jusqu'à 48 h PI.





**Figure 3.3. Effet de l'exposition de cellules RAW264.7 à *B. abortus* sur l'expression de *ppp1r15a* (gène codant pour GADD34).**

Des macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées (colonnes gris clair) ou non (colonnes gris foncé) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 + 10 % SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 5, 24 et 48 h PI, l'ARN total a été extrait et 5 µg ont été utilisés pour générer de l'ADNc par transcription inverse. L'abondance des transcrits a ensuite été mesurée par RT-qPCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'induction par rapport à l'abondance de l'ARNm de *ppp1r15a* dans des cellules contrôles non incubées (temps 0 h). Les ratios d'expression ont été calculés sur base de la méthode  $\Delta\Delta C_t$  avec HPRT (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*) utilisé comme gène de référence (n=1).

Ajoutons encore que, dans chacune de ces hypothèses, on peut envisager que la réponse d'induction de l'expression du gène *Ddit3* résulte d'un processus actif de la part de la bactérie ou soit la conséquence de la simple présence passive d'éléments portés par la bactérie comme des PAMPs qui seraient reconnus par des PRRs. La simple phagocytose pourrait donc également être responsable des éléments conduisant *in fine* à l'induction de l'expression du gène codant pour CHOP10. Dans la suite de ce travail, nous avons donc tenté d'apporter des éléments de réponse à ces différentes questions.

### **1.3. Activité trans-activatrice de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus***

Comme nous venons de le voir, les analyses en immunofluorescence et microscopie confocale ont révélé que CHOP10 est localisé dans le noyau des cellules exposées à la bactérie qui l'expriment. Cette localisation est compatible avec une activité de liaison à l'ADN ainsi qu'une augmentation de la transcription de gènes cibles de CHOP10. Cependant, une localisation nucléaire ne garantit pas nécessairement que le facteur de transcription soit actif. Etant donné que nous ne possédions pas de système rapporteur pour évaluer l'activité de trans-activation de CHOP10 dans un système murin, nous avons décidé de quantifier l'ARNm, par la technique de RT-qPCR en temps réel, de *ppp1r15a*, un gène cible de CHOP10 qui code pour la protéine GADD34 (Figure 3). Pour rappel, GADD34 est une sous-unité régulatrice de PP1 (*Protein Phosphatase 1*) capable, entre autres, de déphosphoryler le facteur eIF2 $\alpha$  phosphorylé au cours d'une réponse UPR<sup>187</sup>.

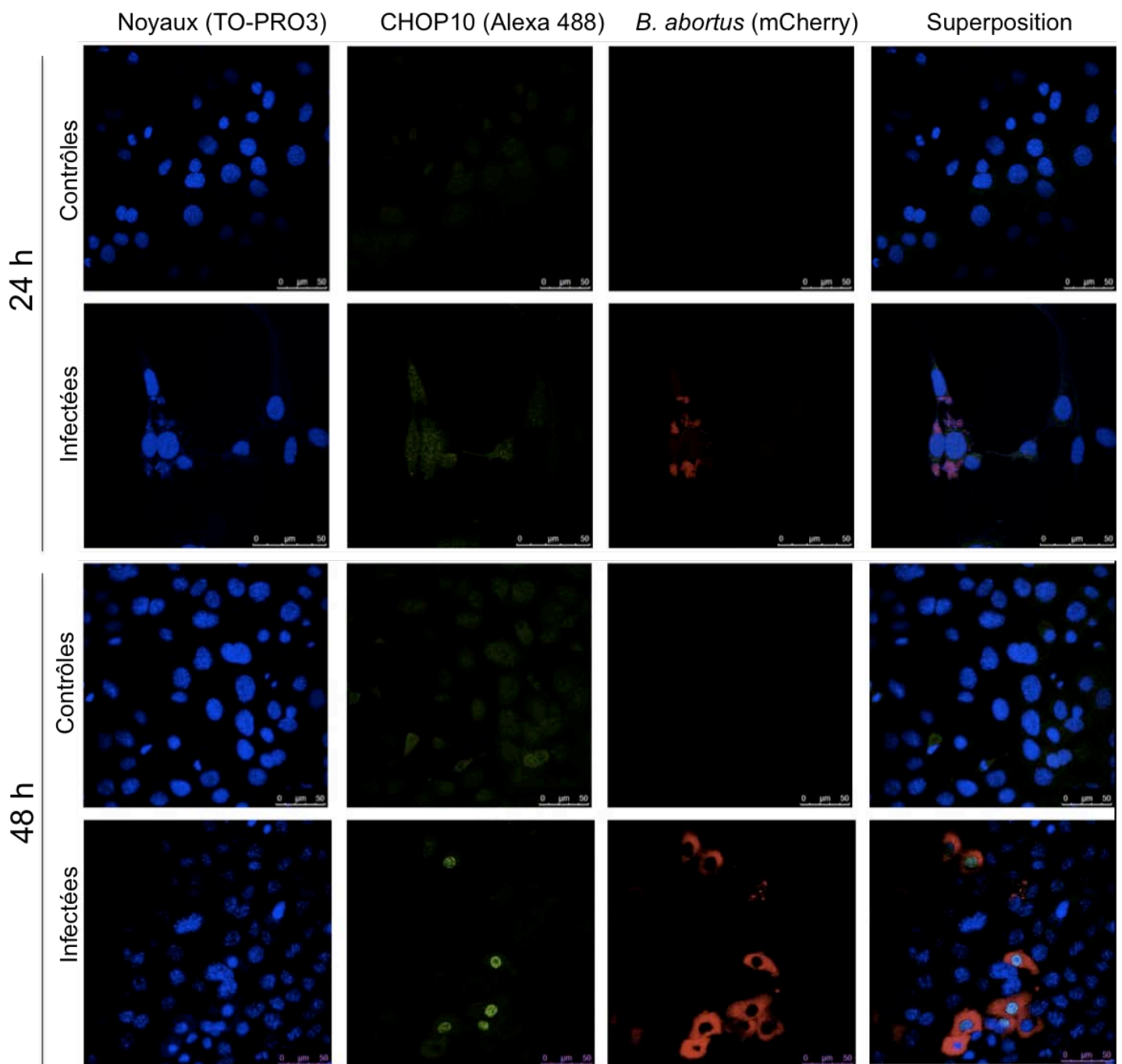
On observe que le profil d'expression de GADD34 est comparable à celui de CHOP10. En effet, l'ARNm de GADD34 est peu abondant dans les cellules contrôles incubées pendant 5, 24 ou 48 h. A 5 h PI, aucune différence d'abondance relative du transcrit de GADD34 n'est observée entre les cellules contrôles ou exposées à *B. abortus*. Par contre, à 24 et 48 h PI, l'abondance de l'ARNm du gène *ppp1r15a* est, respectivement, 5 et 21 fois plus élevée dans les cellules exposées à *B. abortus* que dans les contrôles incubées pendant des temps correspondant (Figure 3.3.).

Il semble donc que le facteur de transcription CHOP10 soit actif dans les cellules exposées à *B. abortus*. Bien évidemment, ce test fournit une corrélation positive suggérant que CHOP10 est actif et susceptible d'induire l'expression de gènes cibles endogènes bien décrits comme GADD34<sup>87</sup>, mais il ne prouve en rien cette affirmation. Pour confirmer la régulation de l'expression de GADD34 par CHOP10 dans nos conditions expérimentales, il faudrait, par exemple, invalider l'expression de CHOP10 à l'aide de siRNA et analyser l'abondance de GADD34 en réponse à une infection par *B. abortus*. En effet, si CHOP10 est responsable de l'expression de *ppp1r15a*, ce dernier ne devrait pas être transcrit dans les cellules n'exprimant plus CHOP10.

### **1.4. Expression de CHOP10 dans d'autres types cellulaires eucaryotes exposés à *B. abortus***

Comme nous avons observé l'induction du gène *Ddit3* dans des phagocytes professionnels exposés à la bactérie, nous nous sommes ensuite posés la question de savoir si l'induction de l'expression de CHOP10 en réponse à l'infection par *B. abortus* était un phénomène spécifique aux macrophages RAW264.7 ou si, au contraire, elle pouvait être observée dans d'autres types cellulaires. Nous avons donc exposé un autre type de cellules eucaryotes et l'avons exposé à *B. abortus* afin d'analyser le niveau d'expression de CHOP10 en réponse à une infection expérimentale.

Dans le cadre de ce travail, nous avons eu l'occasion d'utiliser des cellules MEF (*mouse embryonic fibroblasts*), utilisées par l'URPhyM pour leur étude sur le rôle éventuel de l'autophagie dans le cadre de l'infection par *B. abortus* (E. Goffin, Mémoire 2012).



**Figure 3.4. Marquage en immunofluorescence de CHOP10 et observation en microscopie confocale dans des cellules MEFs exposées à *B. abortus*.**

Les cellules MEFs ont étéensemencées dans des boîtes de culture à 12 puits sur des couvre-objets stériles à une densité de 40 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées à *B. abortus* 2308 mCherry pendant 1 h (MOI = 300) puis incubées dans du DMEM + 10 % de SVF supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine pendant une heure, puis dans du DMEM contenant 10 % de SVF supplémenté de 10 µg/ml de gentamycine pour la fin de l'incubation.

L'immuno-marquage et les observations en microscopie confocale ont été réalisées à 24 et 48 h PI. Les cellules ont été fixées par du PFA à 4 %. Elles ont ensuite été perméabilisées à l'aide de PBS + Triton X-100 à 1 % et marquées avec un anticorps dirigé contre CHOP10. La révélation a été réalisée à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (ALEXA 488). De plus, les noyaux ont été marqués au TO-PRO3. Les micrographies ont été obtenues à l'aide du microscope confocal (Leica) aux longueurs d'ondes suivantes : Ex.  $\lambda$  = 488 nm; Em.  $\lambda$  = 500 - 535 nm (CHOP10 (Alexa 488)); Ex.  $\lambda$  = 543 nm, Em.  $\lambda$  = 555 - 620 nm (*B. abortus* (mCherry)); Ex.  $\lambda$  = 633 nm, Em.  $\lambda$  = 650 - 750 nm (Noyaux (TO-PRO3)).

Nous avons donc exposé ou non des MEFs à *B. abortus* pendant une heure à un MOI de 300 et analysé l'expression de CHOP10 dans ces cellules à 24 et 48 h PI par immuno-marquage en fluorescence et observation en microscopie confocale. Comme on peut le visualiser sur les micrographies présentées à la Figure 3.4., on observe que CHOP10 est bien présent dans le noyau des cellules infectées à 48 h PI. Il est intéressant de souligner la différence qui existe entre le profil d'expression de CHOP10 dans les RAW264.7 et dans les MEFs. En effet, nous avons vu précédemment que les premiers macrophages RAW264.7 à exprimer CHOP10 sont ceux qui ne contiennent pas la bactérie (Figure 3.2. B – 2C). Par contre, pour les MEFs, il semble que CHOP10 soit d'abord (et exclusivement) exprimé dans les cellules infectées. Les raisons de cette différence sont inconnues à ce jour mais mériteraient d'être étudiées.

En conclusion, nous pouvons donc dire que l'induction de l'expression de CHOP10 en réponse à une exposition à *B. abortus* ne semble pas spécifique de la lignée de macrophages RAW264.7 puisque des MEFs, cellules non phagocytaires, sont également capables de répondre à la présence de la bactérie en augmentant l'expression de ce facteur de transcription.

Il serait intéressant de poursuivre ces études en analysant le niveau d'expression de CHOP10 dans des cellules trophoblastiques, des cellules d'origine épithéliale (HeLa), d'autres lignées de macrophages tels que les J774 ainsi que des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages ou KO pour certains PRR particuliers dans le but d'étudier les acteurs moléculaires impliqués dans la perception de la bactérie, tels que les TLR 1, 2 et 4 qui sont capables d'induire la production de cytokines.

### **1.5. Expression de CHOP10 dans des macrophages RAW264.7 exposés à d'autres souches ou mutants de *Brucella*.**

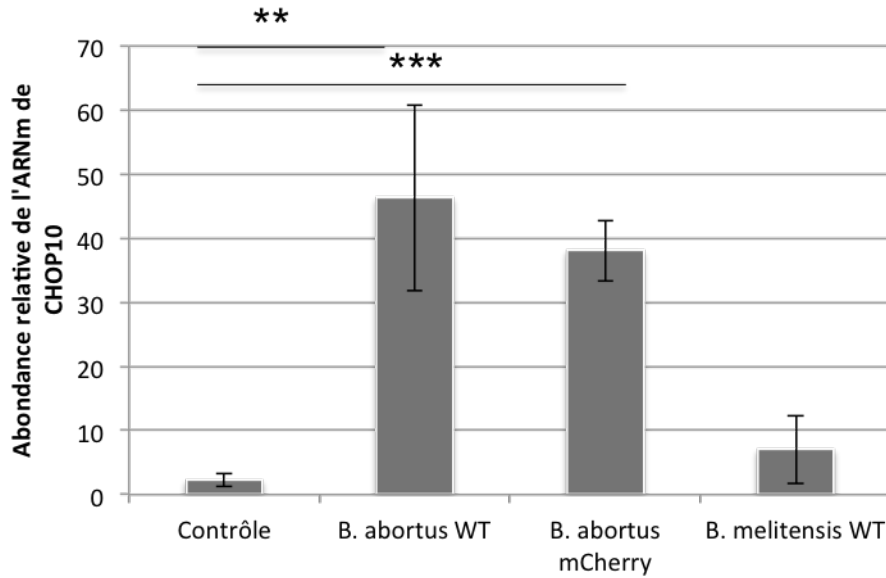
Premièrement, pour des raisons de facilité dans l'évaluation de l'infection, nous avons jusqu'ici employé un mutant de *B. abortus* 2308 produisant constitutivement la protéine fluorescente mCherry. Cette souche permet donc de visualiser rapidement et en microscopie à fluorescence les cellules eucaryotes qui sont infectées par la bactérie.

Nous avons donc voulu vérifier que l'induction de l'expression de CHOP10 observée en réponse à une infection des cellules RAW264.7 par ce mutant était également observée lors d'une infection par la souche sauvage.

Nous avons donc quantifié l'abondance relative du transcrit de CHOP10 par RT-qPCR en temps réel dans des cellules exposées ou non à la souche sauvage ou au mutant mCherry. Nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence une différence significative d'abondance du transcrit de CHOP10 entre des macrophages exposés à la souche sauvage ou à la souche mutante (Figure 3.5.). Il semble donc que l'expression constitutive de la protéine mCherry n'ait pas (ou peu) d'impact sur l'induction de l'expression CHOP10 dans les cellules RAW264.7 exposées à la bactérie. La réponse sur l'induction de l'expression du facteur de transcription étant comparable, nous avons donc continué, dans la suite des expériences menées dans le cadre de ce travail, à utiliser la souche *B. abortus* mCherry, pour des raisons de facilité de visualisation plus aisée qui ne demandent pas de marquage du LPS de la bactérie.

Deuxièmement, nous avons tenté de déterminer si l'induction de CHOP10 dans les cellules infectées était une réponse biologique du macrophage spécifiquement activé en réponse à *B. abortus* ou si l'accumulation de ce facteur de transcription pouvait également s'observer dans les cellules RAW264.7 exposées à d'autres espèces de *Brucella*.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons déterminé, par RT-qPCR en temps réel, l'abondance relative du transcrit du gène *Ddit3* dans des cellules exposées à *B. melitensis* pour un temps de 48 h PI et avons comparé, dans une même expérience, l'abondance de l'ARNm codant CHOP10 dans des phagocytes exposés à *B. abortus* (Figure 3.5.). Bien que



**Figure 3.5. Comparaison de l'effet de l'exposition à différentes espèces et mutants de *Brucella* sur l'expression de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7.**

Des macrophages RAW264.7 ont étéensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées ou non (contrôle) à *B. abortus* 2308 WT, *B. melitensis* 16M ou *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 + 10 % SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 48 h PI, l'ARN total a été extrait et 5 µg ont été utilisés pour générer de l'ADNc par transcription inverse. L'abondance des transcrits a été mesurée par RT-qPCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'induction par rapport à l'abondance de l'ARNm de CHOP10 dans des cellules contrôles non exposées aux bactéries. Les ratios d'expression ont été calculés sur base de la méthode  $\Delta\Delta C_t$  avec HPRT utilisé comme un gène de référence. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  1 écart type pour trois expériences indépendantes (n=3). L'analyse statistique des différences observées entre les cellules contrôles et les cellules exposées à la bactérie a été établie par un test t de Student (\*\*, \*\*\*: significativement différent du contrôle correspondant avec, respectivement :  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ ).

nous observons une légère induction de l'abondance du transcrit de CHOP10 dans les cellules exposées à *B. melitensis*, nous observons que l'amplitude de réponse (non significative) est bien plus faible que lors d'une exposition des macrophages RAW264.7 à *B. abortus* (Figure 3.5.). Il semble donc que l'induction de l'expression de CHOP10 ne soit pas un phénomène généralisable aux bactéries du genre *Brucella*.

Nous proposons deux hypothèses pour tenter d'expliquer ces observations.

Premièrement, la différence dans le taux d'induction de CHOP10 pourrait être due à une différence de comportement des deux bactéries lors de l'infection. En effet, il est possible que la susceptibilité des macrophages RAW264.7 aux deux espèces testées soit différente. Dans ce cas, l'induction de CHOP10 serait moindre car le nombre de cellules infectées serait moindre. Cependant, cette hypothèse est peu probable car les contrôles CFU que nous avons réalisés à 48 h PI ne montrent pas de différence entre les deux conditions. Il est tout de même important de souligner que cette quantification de CFU est une méthode approximative dans nos conditions expérimentales. En effet, aux temps PI auxquels nous travaillons, la charge bactérienne est tellement importante qu'elle nécessite des dilutions importantes pour pouvoir être comptées sur boîte. Chaque dilution amène de l'imprécision supplémentaire, ce qui conduit *in fine* à des résultats peu reproductibles et donc peu fiables, c'est pourquoi nous n'excluons pas cette hypothèse.

De même, nous pourrions envisager que la cinétique d'infection des deux espèces bactériennes soit différente dans ce type cellulaire. En effet, nous n'avons testé qu'un temps PI pour faire la comparaison. Or nous pourrions imaginer que l'induction de CHOP10 débute vers 48 h PI en réponse à *B. melitensis* et que celle-ci est plus intense à des temps PI plus longs.

Deuxièmement, si l'infection par les deux bactéries a effectivement eu lieu de manière similaire, nous pourrions envisager que c'est un composant spécifique à *B. abortus* qui est responsable de l'induction de CHOP10. Le génome de ces deux espèces est très proches<sup>188</sup>. Les génomes de ces deux espèces sont maintenant disponibles, des analyses bioinformatiques ont mis en évidence de différences existant entre les deux génomes. L'identification des gènes encodés par ces séquences permettrait peut-être de déterminer quels composants spécifiques de *B. abortus* pourrait être responsable de l'induction de CHOP10<sup>188,189</sup>. Quelques différences ont déjà été mises en évidence, mais il s'agit essentiellement de gènes associés à des structures de surface ou au LPS<sup>190,191</sup>. Etant donné que nous avons écarté l'hypothèse de l'induction passive due au LPS, ces différences semblent difficilement expliquer la différence dans le taux d'induction de CHOP10 en réponse aux deux espèces.

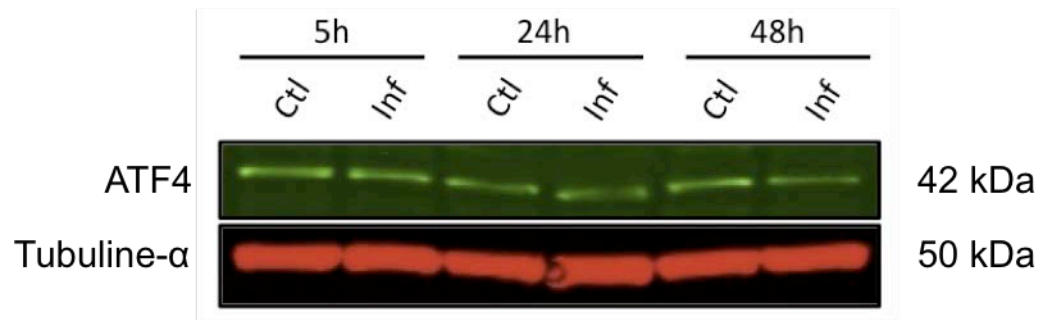
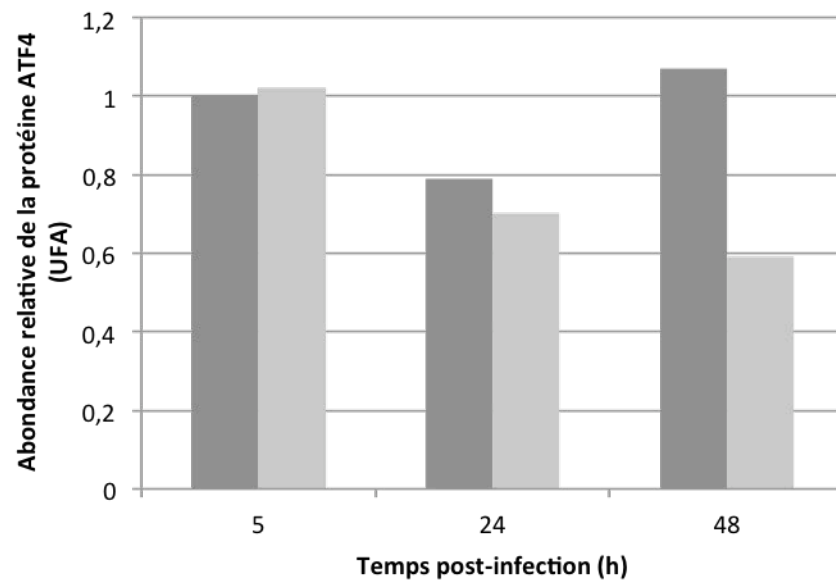
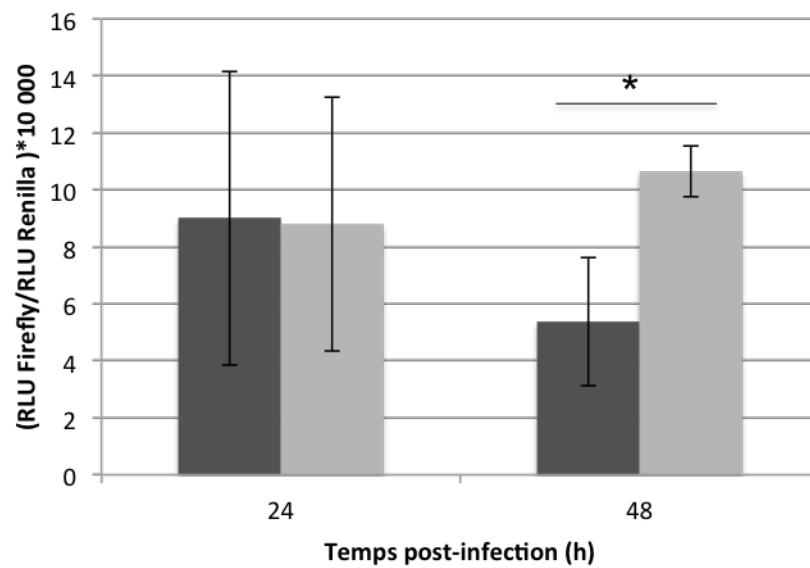
Cette observation est très intéressante puisque malgré la grande proximité des génomes de ces deux espèces, le phénotype d'induction de CHOP10 par celles-ci est très différent.

## **Partie 2 : Etude des mécanismes d'induction de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *Brucella abortus***

### **2.1. Recherche de l'implication de facteurs de transcription activés lors de la réponse UPR dans l'induction de CHOP10 observée dans les macrophages RAW264.7 exposés à la bactérie**

Une étude précédemment menée au laboratoire a montré que parmi différents marqueurs de l'UPR étudiés dans le cadre de la réponse des cellules RAW264.7 à l'infection par *B. abortus* (niveau d'expression des gènes *HERP* (*Homocysteine-induced ER protein*), un gène qui code pour une protéine impliquée dans le système ERAD et dont l'expression est induite par un



**A****B****C**



**Figure 3.6. Effet de l'exposition de macrophages RAW264.7 à *B. abortus* sur l'abondance du facteur ATF4 et l'activité du facteur ATF6.**

**A. et B. Effet de l'exposition des cellules RAW264.7 à *B. abortus* sur l'abondance protéique d'ATF4.** Des macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées (Inf, colonnes gris clair) ou non (Ctl, colonnes gris foncé) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 contenant 10 % SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 5, 24 et 48 h PI, des lysats cellulaires clairs ont été préparés et leur concentration protéique a été déterminée par la méthode de Pierce. Une quantité de 20 µg de protéines a été chargée sur gel Nu-PAGE 10 %. Les protéines ont ensuite été séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse et transférées sur une membrane PVDF. (A) L'abondance des protéines d'intérêt a été analysée par Western blotting avec des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes CHOP10 (IgG de lapin) et tubuline-α (IgG de souris), eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires, IgG de chèvre dirigés contre les anticorps de lapin et couplés un fluorochrome (IRDYE 800 nm) pour CHOP10 et IgG de chèvre spécifique dirigés contre les anticorps de souris couplés à un fluorochrome (IRDYE 680 nm) pour la tubuline-α. (B) L'intensité du signal de fluorescence associé aux bandes des protéines d'intérêt a été quantifiée avec le programme Odyssey Infrared Imaging System. L'immuno-détection de la tubuline-α a été utilisée pour contrôler la charge protéique. L'abondance de la protéine d'intérêt mesurée a ensuite été normalisée par rapport à l'abondance de la tubuline-α. Les résultats sont donc exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UAF) normalisée par rapport à la tubuline-α (n=1).

**C. Effet de l'exposition des macrophages RAW264.7 à *B. abortus* sur l'activité trans-activatrice du facteur de transcription ATF6.** Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des boîtes de culture à 12 puits à une densité de 200 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été co-transfectées avec deux plasmides à l'aide d'un transfectant chimique (Fugène HD). Le premier plasmide (pGL3-ATF6-luc) est un plasmide rapporteur qui contient le gène de la luciférase *Firefly* placé sous le contrôle du promoteur d'ATF6 ou, pour les blancs, un plasmide contenant le gène de la luciférase dépourvu de promoteur (pGL3-basic). Le second plasmide est un plasmide d'expression code pour le gène de la luciférase *Renilla* placé sous contrôle d'un promoteur viral constitutif et fort (SV40) et sert à la normalisation des résultats.

Après 24 h, les cellules ont été exposées (colonne gris clair) ou non (colonne gris foncé) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 + 10 % SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 24 et 48 h PI, les cellules ont été lysées et les activités luciférase ont été dosées au luminomètre à l'aide du kit Dual luciférase (Promega). Après avoir soustrait les valeurs de blancs, les résultats sont exprimés en tant que ratio des valeurs obtenues pour la luciférase *firefly* rapportées aux valeurs obtenues pour la luciférase *renilla*, et ce, afin de prendre en compte l'efficacité de la transfection. Les résultats représentent la moyenne ± 1 écart type pour des triplicats au sein d'une même expérience (n=3). L'analyse statistique des différences observées entre les cellules contrôles et les cellules exposées à la bactérie a été établie par un test t de Student (\* : statistiquement différent du contrôle correspondant avec p < 0,05).

stress du RE, *BiP/GRP78*, *Ddit3/CHOP10*, l'abondance de la forme phosphorylée de eIF2 $\alpha$  et l'activité du facteur de transcription XBP1s (voir introduction point 2.2.2. pour la biologie de ces facteurs dans la réponse UPR)), seule l'induction du gène *Ddit3* codant pour CHOP10 était observée en réponse à l'exposition des macrophages RAW 264.7 à *B. abortus* (Nicolas Lebailly, mémoire 2011).

Il semble donc que l'induction de l'expression de CHOP10 dans les macrophages observée en réponse à *Brucella* soit indépendante de l'activation d'une réponse UPR. De plus, le fait que CHOP10 soit, dans un premier temps, uniquement exprimé dans les cellules qui ne contiennent pas la bactérie est difficilement conciliable avec le fait qu'un stress du réticulum soit à l'origine de l'expression de CHOP10 dans ces conditions. Cependant, nous n'avons aucun argument expérimental pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Nous avons vu dans l'introduction (voir point 3.3.1.) que CHOP10 pouvait, dans le cadre de la réponse UPR, être régulé par les effecteurs des trois voies, c'est-à-dire ATF4, ATF6 et XBP1. Bien que l'étude précédente ne soit pas parvenue à montrer une activation du facteur de transcription XBP1 dans les macrophages répondant à l'infection par *Brucella*, ni de changement dans l'abondance de la forme phosphorylée du facteur eIF2 $\alpha$  connue pour augmenter la traduction de l'ARNm codant pour le facteur ATF4<sup>192</sup>, aucune information n'est disponible sur l'abondance ni sur l'état d'activité des facteurs ATF4 et ATF6 dans les macrophages exposés à la bactérie.

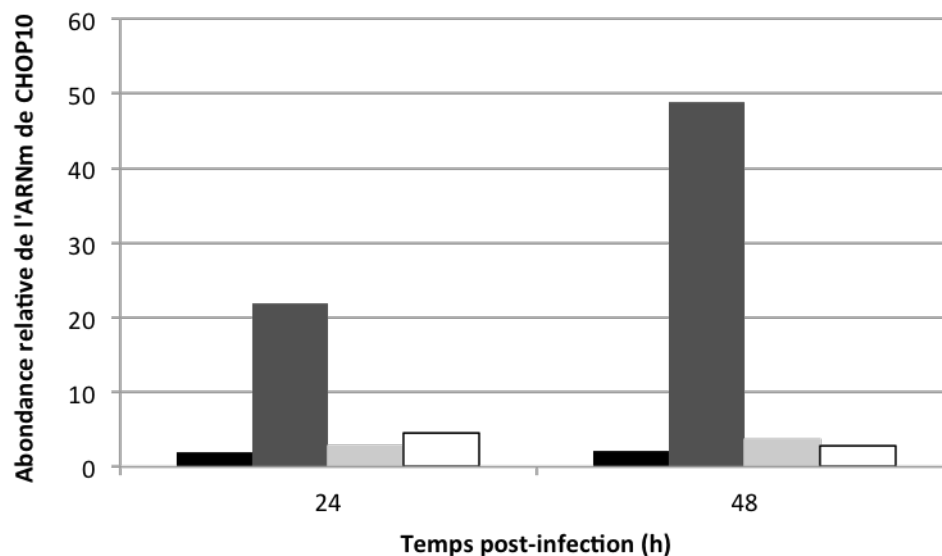
Nous avons donc recherché l'implication potentielle de ces facteurs dans l'induction de CHOP10. Nous avons donc analysé, respectivement, l'abondance ou l'activité du facteur ATF4 ou ATF6 dans des cellules RAW264.7 exposées ou non à la bactérie.

Dans un premier temps et comme nous ne disposions pas de plasmide rapporteur pour analyser l'activité du facteur de transcription ATF4, nous avons décidé d'analyser son abondance protéique par Western blot dans des extraits totaux préparés à partir de cellules RAW264.7 exposées à la bactérie ou non et ce, à différents temps PI (5, 24 et 48 h) (Figure 3.6. A). Dans ces conditions, nous n'observons pas d'augmentation de l'abondance protéique du facteur ATF4 dans les macrophages infectés par la bactérie. Au contraire, les résultats de la quantification du Western blot (Figure 3.6. B) semblent même montrer une légère diminution de l'abondance du facteur ATF4 au cours du temps dans les cellules RAW264.7 exposées à *B. abortus* (Figure 3.6. B). Cependant, il est important de noter que dans certaines conditions, l'activité du facteur d'ATF4 est régulé de manière post-traductionnelle via une séquestration par la protéine ZIP-kinase<sup>146</sup>, l'abondance du facteur n'est donc pas un critère suffisant pour estimer son activité et le contrôle de l'expression de ces gènes cibles.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'activité du facteur ATF6 dans les cellules RAW264.7 infectées par *Brucella* à l'aide d'un système rapporteur luciférase.

Nous avons donc co-transfecté des cellules RAW264.7 avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur sensible à ATF6<sup>193</sup> et un plasmide d'expression contenant le gène codant la luciférase de *Renilla* placé sous contrôle d'un promoteur viral fort et constitutif (pRL-SV40, Promega) (ce deuxième plasmide est utilisé pour la normalisation des résultats) avant d'être exposées à *B. abortus*. Les activités luciférase ont ensuite été dosées à 24 ou 48 h PI dans le lysat des cellules transfectées puis exposées ou non à *B. abortus* (Figure 3.6. B).

Les résultats montrent qu'il n'y pas de différence d'activité de la luciférase, et donc de l'activité du facteur ATF6, dans des cellules RAW264.7 exposées à la bactérie pour un temps de 24 h après l'infection. Alors que dans les mêmes conditions, l'expression de CHOP10 est déjà augmentée (Figure 3.1.).



**Figure 3.7. Effet de l'exposition de macrophages RAW264.7 à des bactéries *B. abortus* mortes ou vivantes sur l'induction de CHOP10.**

Des macrophages RAW264.7 ont étéensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées ou non (cellules contrôles, colonnes noires) à *B. abortus* 2308 mCherry vivantes (colonnes gris foncé), des bactéries fixées à la PFA (4%) (colonne gris clair) ou tuées à la chaleur (colonnes blanches) et ce, pendant une 1 h (MOI = 300). Les cellules ont ensuite été incubées dans du DHG-L1 contenant 10 % de SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 24 et 48 h PI, l'ARN total a été extrait et 5 µg ont été utilisés pour générer de l'ADNc par transcription inverse. L'abondance des transcrits a ensuite été mesurée par RT-qPCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'induction par rapport à l'abondance de l'ARNm de CHOP10 dans des cellules contrôles non incubées (temps = 0 h). Les ratios d'expression ont été calculés sur base de la méthode  $\Delta\Delta C_t$  avec HPRT utilisé comme gène de référence (n=1).

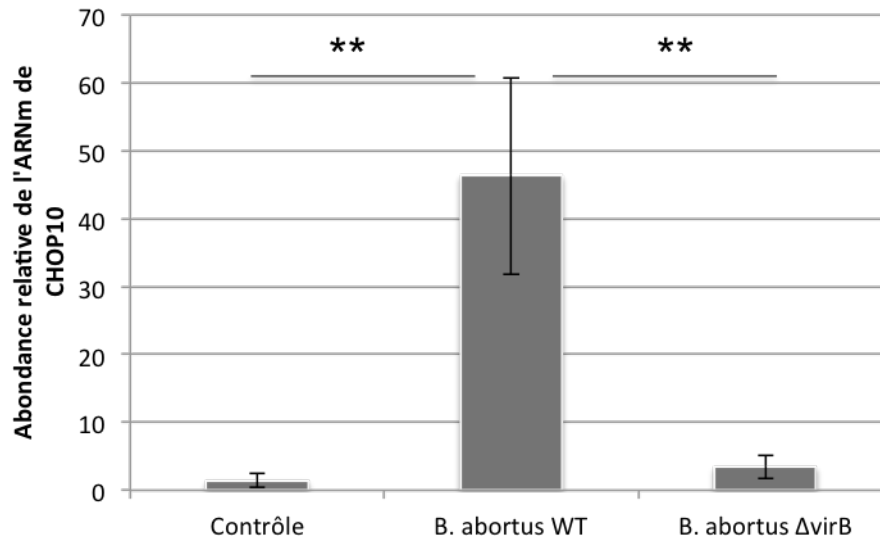
Par contre, pour un temps de 48 h PI, l'activité d'ATF6 est deux fois plus importante dans les macrophages infectés par *B. abortus* que dans les cellules contrôles (Figure 3.6. C). Cependant, les résultats de cette expérience sont tout à fait préliminaires et doivent être analysés avec précaution et ce, pour différentes raisons. Premièrement, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et est donc à répéter. Deuxièmement, lorsque l'on compare les valeurs absolues de l'activité de la luciférase obtenues aux deux temps PI, il semble que la différence observée à 48 h PI soit essentiellement due à une diminution de l'activité de la luciférase dans les cellules contrôles plutôt qu'à une véritable augmentation de celle-ci dans les cellules infectées (Figure 3.6. C). Il n'y a pas de raison apparente, ni d'explication à cette chute de l'expression d'ATF6 observée au cours du temps dans les cellules contrôles à 48 h. Ajoutons encore que de manière inattendue, dans cette condition, les valeurs obtenues pour les blancs (que nous avons soustraits des valeurs expérimentales) étaient anormalement élevées par rapport à celles obtenues pour les tests, ce qui pourrait expliquer cette différence. Il est donc possible que cette pseudo-activation d'ATF6 dans les cellules RAW264.7 exposées à la bactérie soit un artéfact. De plus, même si l'activité d'ATF6 était effectivement deux fois plus importante à 48 h PI, il est peu probable que ce facteur soit responsable de l'induction de *Ddit3* codant pour CHOP10 puisque celui-ci est déjà exprimé dans les macrophages exposés à *B. abortus* pour un temps de 24 h PI, alors que, dans ces conditions, l'activité d'ATF6 dans les cellules exposées à la bactérie n'est pas différente de celle mesurée pour les cellules contrôles (Figure 3.6. C).

Pour obtenir un argument expérimental permettant de mettre en évidence un éventuel lien causal entre l'activité des facteurs ATF4 et/ou ATF6 dans le contrôle de l'induction du gène *Ddit3* dans des macrophages infectés par *B. abortus*, nous devrions tester l'effet éventuel du silençage/de l'invalidation de l'expression de ces facteurs sur le niveau d'expression de CHOP10 dans le modèle d'infection.

Comme mentionné précédemment, le fait que l'induction de *Ddit3* soit observée *in fine* dans l'ensemble des cellules, qu'elles contiennent ou non la bactérie, pourrait être expliqué par au moins deux hypothèses. L'hypothèse du contact et celle de la communication intercellulaire. Afin de tenter de déterminer laquelle de ces hypothèses est correcte, nous avons analysé le niveau d'expression de CHOP10 dans des macrophages exposés à des bactéries vivantes ou des bactéries mortes.

En effet, une étude publiée en 2010 montre que du LPS soluble de *E. coli* est capable d'induire l'expression de CHOP10 de manière plus tardive que l'induction observée en réponse à une stimulation des macrophages avec des agents inducteurs d'un stress du RE tels que la tunicamycine et thapsigargine<sup>168</sup>. En effet, dans ces conditions, l'induction de CHOP10 est observée 12 h après la stimulation. Il semble que ce retard puisse être expliqué par les voies de signalisation activées. Le LPS d'*E. coli* semble essentiellement activer les voies de signalisation en aval d'ATF6 et de IRE1<sup>168</sup>. Or, comme nous l'avons vu dans l'introduction, la principale voie responsable de l'activation de CHOP10 dans le cadre d'une réponse UPR est principalement celle initiée par PERK et médiée par ATF4<sup>97,136</sup>. Dans ces conditions, l'absence d'apoptose observée en réponse à l'induction de CHOP10 pourrait s'expliquer par l'accumulation de facteurs favorisant la survie tels que BiP, EDEM ou p58IPK avant l'expression de CHOP10, empêchant ainsi l'action pro-apoptotique de ce facteur de transcription<sup>168</sup>.

Bien que le timing d'expression soit compatible avec celui observé dans les macrophages en réponse à l'exposition à *B. abortus*, l'hypothèse de l'activation retardée par le LPS de *Brucella* est peu probable. Premièrement, le LPS de *B. abortus* est beaucoup moins endotoxique que celui d'*E. coli*, en effet son lipide A non canonique n'est reconnu par le TLR4 qu'à des concentrations très importantes<sup>194</sup>. Deuxièmement, dans l'étude rapportée



**Figure 3.8. Effet de l'exposition à *B. abortus* WT et *B. abortus*  $\Delta virB$  sur l'expression de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7.**

Des macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées ou non (cellules contrôles) à *B. abortus* sauvage ou un mutant  $\Delta virB$  pendant une 1 h (MOI = 300). Les cellules ont ensuite été incubées dans du DHG-L1 contenant 10 % SVFi supplémenté de 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamycine. A 48 h PI, l'ARN total a été extrait et 5  $\mu\text{g}$  ont été utilisés pour générer de l'ADNc par transcription inverse. L'abondance des transcrits a ensuite été mesurée par RT-qPCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'induction par rapport à l'abondance de l'ARNm de CHOP10 dans des cellules contrôles non incubées (temps = 0 h). Les ratios d'expression ont été calculés sur base de la méthode  $\Delta\Delta\text{Ct}$  avec HPRT considéré comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  1 écart type pour 3 expériences indépendantes  $n=3$ . L'analyse statistique des différences observées entre les cellules contrôles et les cellules exposées à la bactérie a été établie par un test t de Student (\*\*: significativement différent du contrôle correspondant avec, respectivement :  $P<0,01$ ).

pour la stimulation des cellules par le LPS solubles de *E. coli*, d'autres marqueurs de la réponse UPR sont détectés à des temps plus précoces<sup>168</sup> alors que l'activation de tels marqueurs n'a pas pu être mise en évidence dans les macrophages exposés à *Brucella* (Nicolas Lebailly, Mémoire 2011). De plus, l'induction de l'expression de CHOP10 est de plus en plus importante au cours du temps et est donc corrélée à l'augmentation de la charge bactérienne suite à la réplication de la bactérie au cours du temps PI, ce qui correspondrait plus à un processus actif nécessitant une bactérie vivante et non la simple phagocytose de bactéries mortes.

Néanmoins, pour écarter l'hypothèse d'un processus passif responsable de l'induction du gène *Ddit3* qui résulterait de la simple présence de PAMPs entrant en contact avec les macrophages, nous avons donc analysé, par RT-qPCR en temps réel, l'abondance relative de l'ARNm de *Ddit3* dans des cellules exposées à des bactéries vivantes ou à des bactéries mortes et ce, à 24 et 48 h PI. De plus, nous avons comparé deux méthodes pour générer des bactéries mortes : la fixation au paraformaldéhyde et une incubation à la chaleur (80 °C) (Figure 3.7.). Nous observons que l'expression de CHOP10 est 21 et 49 fois plus importante dans des cellules exposées à *B. abortus* vivante que dans les cellules contrôles pour, respectivement, des temps de 24 et 48 h PI. Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de CHOP10 dans les cellules exposées à des bactéries mortes et ce, quel que soit la manière dont les bactéries ont été inactivées. Ces résultats suggèrent donc que l'induction de CHOP10 est un processus qui requiert des bactéries vivantes, ce qui élimine l'hypothèse du contact des PAMPs de surface tels que le LPS ou de la simple phagocytose de bactéries mortes.

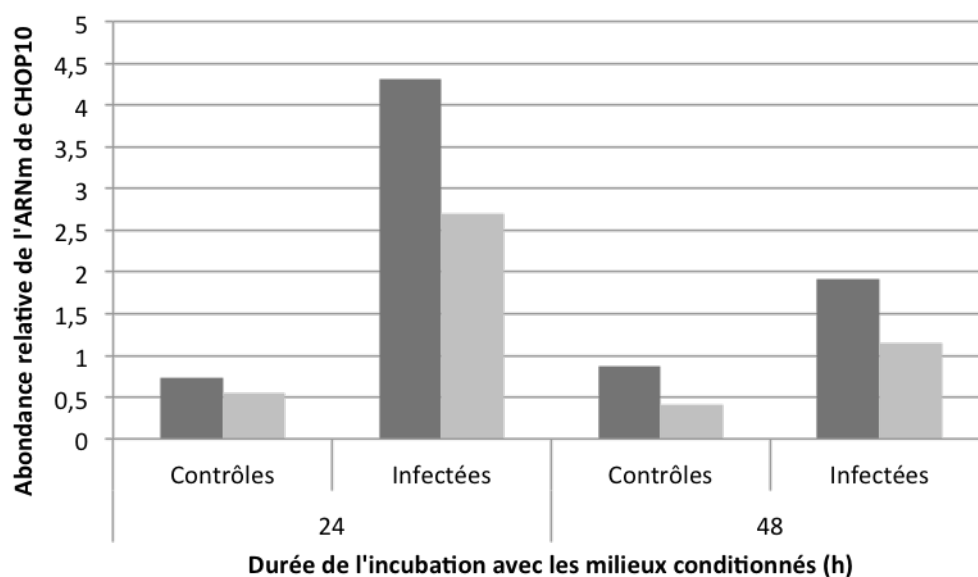
### **2.3. Etude de l'effet du mutant *virB* sur l'expression de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7**

Etant donné que l'induction de CHOP10 nécessite des bactéries vivantes, nous avons voulu tester l'implication du mutant *virB* dans ce processus. En effet, comme développé dans l'introduction (voir Introduction, Boite 2), l'opéron *virB* code pour un système de sécrétion de type 4 permettant la translocation d'effecteurs bactériens dans le cytoplasme de la cellule infectée. Ces effecteurs sont fortement impliqués dans la virulence de la bactérie et servent souvent à manipuler certaines fonctions cellulaires de la cellule eucaryote.

Pour tenter de mettre en évidence une éventuelle implication de ce système dans la réponse conduisant à l'expression de CHOP10 dans les macrophages infectés par *Brucella*, nous avons quantifié l'expression du gène codant pour CHOP10, en RT-qPCR en temps réel, dans des macrophages RAW264.7 exposés à la souche sauvage de *B. abortus* ou à une souche délétée de l'opéron *virB* et ce, pour un temps de 48 h PI (Figure 3.8.). Nous pouvons observer qu'il existe une différence hautement significative entre l'induction de CHOP10 observée dans les cellules exposées à la souche sauvage et celle observée dans les cellules exposées à la souche délétée de l'opéron *virB* (Figure 3.8.) puisque dans ces conditions, le niveau d'expression de CHOP10 est comparable à celui obtenu pour des cellules contrôles.

En conclusion, ces résultats suggèrent donc que l'opéron *virB*, et donc l'assemblage du T4SS, est nécessaire à l'induction de CHOP10 dans les cellules RAW264.7 exposées à *B. abortus*.

Pour vérifier cette hypothèse, une expérience complémentaire devrait être réalisée. En effet, la délétion d'un opéron entier tel que *virB* peut avoir des répercussions majeures sur la physiologie de la bactérie. Pour confirmer que c'est effectivement, l'absence de cet opéron, et donc du T4SS qui est responsable de l'absence d'induction de CHOP10, nous pourrions réaliser une expérience de « *rescue* ». Celle-ci consiste à introduire un plasmide codant pour l'opéron *virB* sous contrôle de son promoteur dans les bactéries délétées de cet opéron au niveau génomique. Si l'induction de CHOP10 est restaurée alors nous pourrions affirmer que



**Figure 3.9. Effet d'une incubation de macrophages RAW2764.7 naïfs avec des milieux de culture conditionnés de macrophages préalablement exposés à *B. abortus*.**

Des macrophages RAW264.7 ont été ensemencés des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées (infectées) ou non (contrôles) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 contenant 10 % de SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine pendant 33 h PI.

Les milieux conditionnés ont été récoltés et filtrés sur un filtre de 0,22 µm. Ils ont ensuite été incubés (colonnes gris clair) ou non (colonnes gris foncé) pendant 15 min à 80 °C avant d'être transférés sur des cellules RAW264.7 naïves pendant 24 ou 48 h.

Au terme de ces incubations, l'ARN total a été extrait et 5 µg ont été utilisés pour générer de l'ADNc par transcription inverse. L'abondance des transcrits a été mesurée par RT-qPCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les niveaux d'expression ont été calculés sur base de la méthode  $\Delta\Delta C_t$  avec HPRT utilisé comme un gène de référence. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'induction calculés par rapport à l'abondance de l'ARNm de CHOP10 dans des cellules contrôles incubées avec du milieu frais pendant 24 ou 48 h (n=1).

l'opéron *virB* est effectivement nécessaire à l'induction de l'expression de ce facteur dans les macrophages exposés à la bactérie.

#### **2.4. Recherche de l'existence d'une communication soluble intercellulaire**

Nous avons montré que l'induction de CHOP10 est due à un processus actif nécessitant non seulement que la bactérie soit vivante, mais également qu'elle exprime son T4SS. Attardons nous un instant sur la cinétique et le pattern d'expression de CHOP10 au cours de l'infection et rappelons que les premières cellules à présenter une accumulation du facteur de transcription sont des cellules qui ne sont pas infectées. Nous avons donc décidé de tester l'hypothèse d'une communication soluble intercellulaire. Cette hypothèse repose sur le fait que l'infection des macrophages par *Brucella* pourrait conduire à une ou plusieurs voies de signalisation susceptibles de modifier l'activation de facteurs de transcription conduisant à augmenter l'expression d'un ou de plusieurs médiateur(s) soluble(s) (cytokines ou autres) qui par une action paracrine et autocrine, finirait, à leur tour, par activer une (ou plusieurs voies de signalisation) conduisant à l'induction du facteur CHOP10.

Pour tester l'hypothèse de la libération de molécules solubles dans le milieu extracellulaire, susceptibles d'induire l'expression du gène dans des cellules non infectées, nous avons d'abord infecté des cellules RAW264.7 avec *B. abortus* puis, à 33 h PI, nous avons transféré les milieux de culture conditionnés sur des macrophages naïfs, n'ayant jamais été en présence de la bactérie. L'étude de l'effet de ces milieux de culture conditionnés de cellules RAW264.7 sur le niveau d'expression de CHOP10 dans des cellules naïves incubées avec ces milieux devrait donc nous renseigner sur la présence, dans ces milieux, de molécules susceptibles d'induire l'expression du gène *Ddit3*.

Les milieux conditionnés utilisés ont subi différents traitements : premièrement, ils ont été filtrés sur un filtre de 0,22 µm afin de limiter l'effet de la contamination de ces milieux par des bactéries mortes (et/ou débris). Deuxièmement, les milieux conditionnés ont été dilués deux fois dans du milieu de culture frais, afin de palier l'accumulation de déchets du métabolisme cellulaire et la déplétion de différents facteurs de croissance, nutriments,...essentiels à la survie (et qui ont été respectivement générés ou consommés au cours de la première incubation), et permettre ainsi la survie des cellules naïves incubées en présence de ces milieux. Après 24 ou 48 h d'incubation des cellules RAW264.7 avec ces milieux, l'ARN total a été extrait et l'abondance relative de l'ARNm de *Ddit3* a été analysée par RT-qPCR en temps réel (Figure 3.9.).

Sur cette figure, on peut voir que la présence des milieux de culture conditionnés filtrés est suffisante pour induire l'expression de CHOP10, surtout après 24 h d'incubation (2,6 fois pour les milieux filtrés et chauffés). Cette induction peut paraître faible et transitoire (car elle n'est plus vraiment visible pour un temps de 48 h d'incubation) par rapport à l'induction de l'expression de *Ddit3* observée lors d'une infection, mais il existe plusieurs raisons qui permettraient d'expliquer ces observations. Premièrement, les traitements subis par les milieux conditionnés (filtration, dilution et chauffage à 80 °C visant à dénaturer les molécules de nature protéique) diminuent la concentration de médiateurs solubles présente dans le milieu. Deuxièmement, le fait que les cellules productrices de ces médiateurs, c'est-à-dire les cellules infectées, soient absentes du système étudié fait que les médiateurs pourraient être dégradés (ou internalisés) sans être remplacés.

Ensuite, nous avons voulu déterminer la nature des médiateurs solubles présents dans les milieux de culture conditionnés de cellules RAW264.7 infectées par *B. abortus*. En effet, les résultats d'une étude publiée en 2009 ont montré que ce phénomène de communication intercellulaire existe entre les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus* et que celle-ci fait intervenir des médiateurs de nature protéique. En effet, des cellules infectées sécrètent de

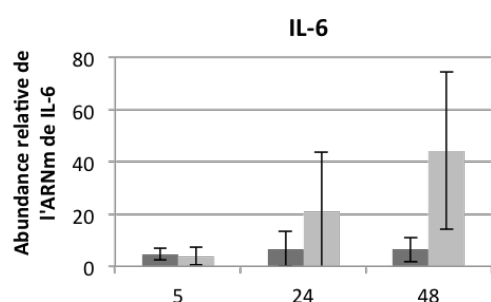


**A**

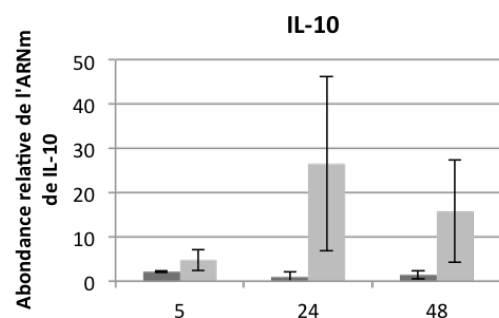
Cytokine / Chémokine	Méthode de quantification	Variation d'abondance
IL-1 $\alpha$	ELISA + RT-qPCR	Yes
IL-1 $\beta$	ELISA + RT-qPCR	Yes
IL-6	ELISA + RT-qPCR	Yes
IL-10	ELISA + RT-qPCR	Yes
IL-12	ELISA	No
IL-23	ELISA	No
IFN $\gamma$	ELISA + RT-qPCR	No
TNF $\alpha$	ELISA	Yes
MCP-1	ELISA	No
GM-CSF	ELISA	No
MIP-1a	ELISA	No
MIP-1b	ELISA	No
TGF $\beta$	RT-qPCR	No
INF $\alpha/\beta$	RT-qPCR	Yes
KC	RT-qPCR	Yes

## RT-qPCR

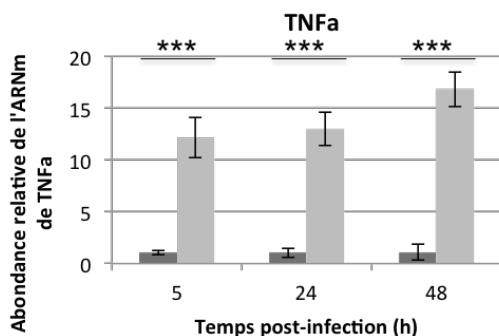
**B**



**C**

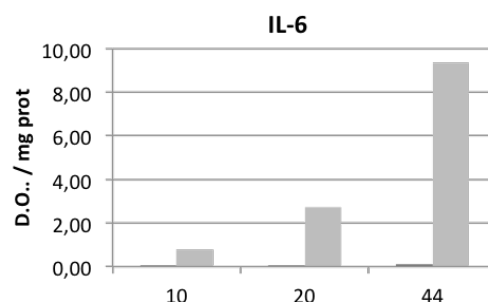


**D**

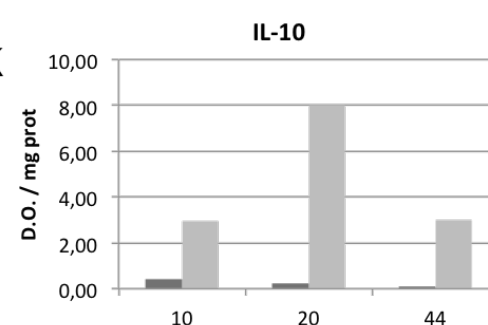


## ELISA

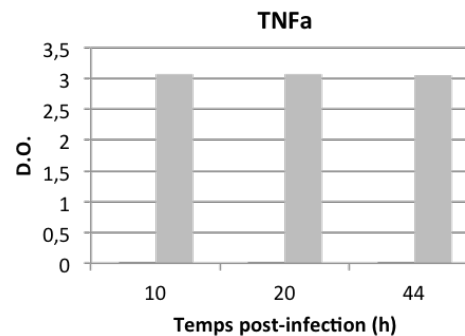
**J**



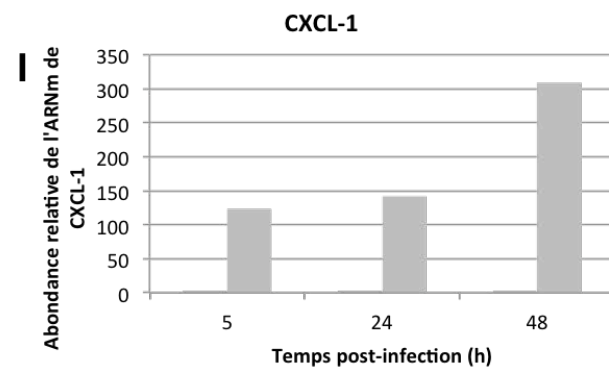
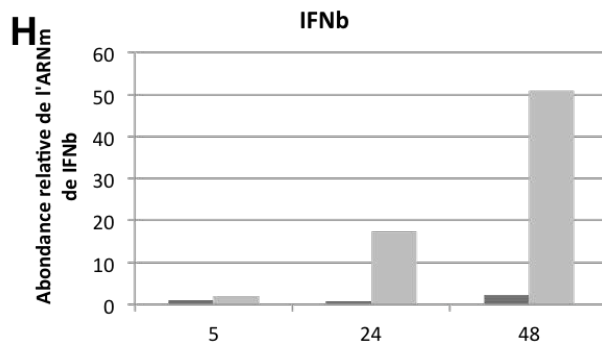
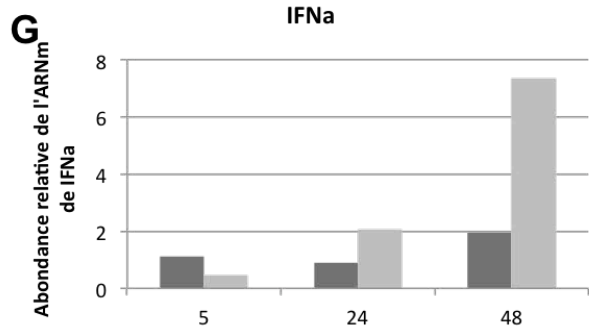
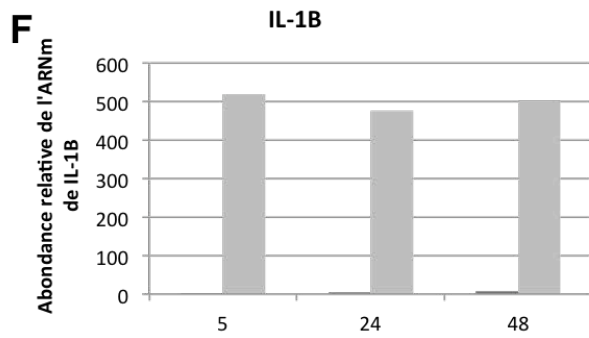
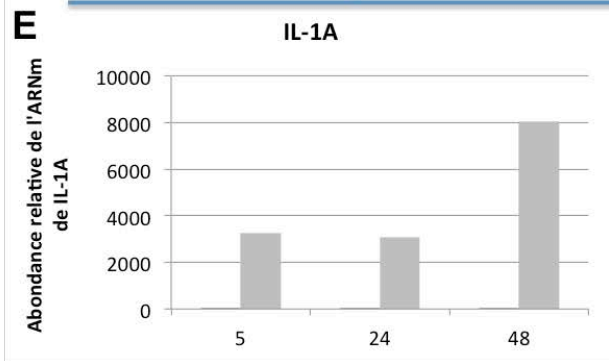
**K**



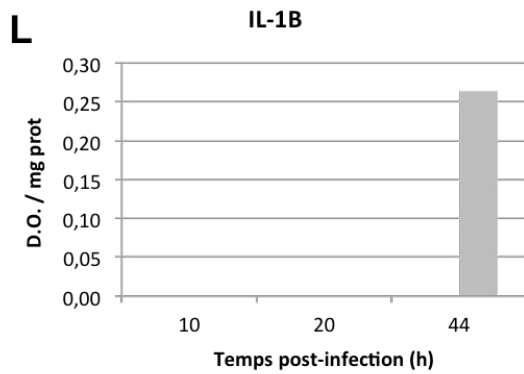
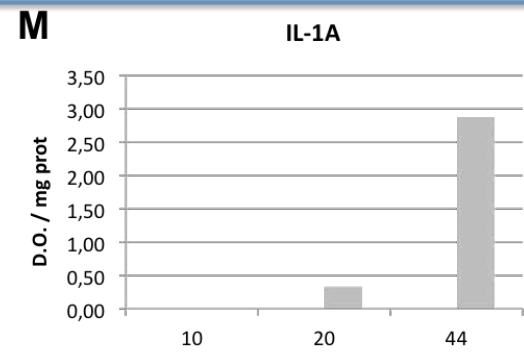
**L**



## RT-qPCR



## ELISA



**Figure 3.10. Analyse de l'abondance de différentes cytokines/chémokines exprimées et/ou sécrétées par les macrophages RAW264.7 en réponse à une exposition à *B. abortus*.**

**A.** Liste des cytokines et chémokines analysées et pour chacune d'elles, la (les) méthode(s) de quantification utilisées et le résultat obtenu dans les cellules RAW 264.7 exposées à *B. abortus*.

**B.-I.** Des macrophages RAW264.7 ont étéensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées (colonnes gris clair) ou non (colonnes gris foncé) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 contenant 10 % de SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 5, 24 et 48 h PI, l'ARN total a été extrait et 5 µg ont été utilisés pour générer de l'ADNc par transcription inverse. L'abondance relative des ARNm codant pour l'IL-6 (B), l'IL-10 (C), le TNFα (D), l'IL-1A (E), l'IL-1B (F), l'IFNα (G), l'IFNβ (H) et le CXCL-1 (I) a été mesurée par RT-qPCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'induction par rapport à l'abondance des ARNm correspondant dans des cellules contrôles (incubées pendant le même temps dans du milieu DHG-L1 contenant 10 % de SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine). Les valeurs d'expression ont été calculés sur base de la méthode  $\Delta\Delta C_t$  avec HPRT utilisé comme gène de référence et sont exprimées comme le ratio entre l'abondance d'un transcrit et l'abondance de ce transcrit obtenue pour les cellules contrôles. Pour E à I, n=1. Pour B à D, les résultats présentés constituent la moyenne  $\pm$  1 écart type pour 3 expériences indépendantes (n=3). L'analyse statistique des différences observées entre les cellules contrôles et les cellules exposées à la bactérie a été établie par un test t de Student (\*\*\* : statistiquement significativement du contrôle avec  $P < 0,001$ ).

**J.-N.** Les macrophages RAW264.7 ont étéensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été exposées (colonnes gris clair) ou non (colonnes gris foncé) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant 1 h (MOI = 300), puis incubés dans du DHG-L1 + 10 % SVFi supplémenté avec 50 µg/ml de gentamycine. A 10, 20 et 44 h PI, les milieux de culture conditionnés ont été collectés et filtrés sur filtre 0,22 µm. Les cytokines ont été quantifiées à l'aide du kit « Multi Analyte ELISArray<sup>TM</sup> (SA biosciences). Les tapis cellulaires ont ensuite été lysés avec du NaOH 0,5 N et la concentration en protéines a été quantifiée par la méthode de Folin. Les valeurs (sauf F) ont été exprimées en valeurs de D. O D.O. obtenues par ELISA normalisées par la quantité de protéines associée au tapis cellulaire correspondant (n=1).

l'interféron de type I (IFN $\alpha/\beta$ ) qui va être responsable de l'induction d'une IRG (*Immunity related GTPase*) comme *Irgm3* par les cellules ne contenant pas la bactérie<sup>195</sup>.

Les IRGs sont des GTPases impliquées dans la défense contre les pathogènes intracellulaires notamment en perturbant le trafic intracellulaire de la vacuole qui les contient<sup>196</sup>. Afin de tester si le(s) médiateur(s) soluble(s) est/sont de nature protéique, nous avons voulu imposer un traitement dénaturant aux milieux de culture conditionnés avant de les incubés avec les cellules naïves. Nous avons choisi un traitement de dénaturation à la chaleur afin d'éviter les modifications de composition des milieux conditionnés. La température de dénaturation des protéines est communément fixée à 100°C. Cependant, nous n'avons pas pu travailler dans ces conditions car ce traitement provoquait la mort des cellules incubées avec les milieux de culture conditionnés ainsi traités et ce, qu'ils proviennent de cellules contrôles ou de cellules infectées (données non montrées). C'est la raison pour laquelle nous avons seulement chauffé les milieux conditionnés à 80 °C pendant 20 min (Figure 3.9.). Nous pouvons voir que l'abondance de l'ARNm de *Ddit3* est environ diminuée de 40 % par rapport à l'induction obtenue lorsqu'on incube les cellules naïves avec un milieu conditionné filtré mais non chauffé. La diminution partielle suggère qu'au moins une partie de l'induction de l'expression de CHOP10 est due à un facteur de nature protéique.

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le fait que 60 % de l'induction sont conservés après l'incubation des milieux conditionnés à 80 °C. Premièrement, nous ne sommes pas certains que 80 °C soit une température suffisante pour dénaturer l'ensemble des protéines. Pour s'en assurer nous pourrions comparer les résultats obtenus avec d'autres méthodes de dégradation des protéines comme, par exemple, un traitement avec des protéases. Deuxièmement, si les protéines ont effectivement été dénaturées, nous ne pouvons pas exclure qu'un repliement, même partiel, ne puisse pas avoir lieu. En effet, des fragments/domaines de protéines repliées pourraient être suffisants pour induire la réponse cellulaire suite à une liaison à leur récepteur. Troisièmement, le mécanisme de communication intercellulaire responsable de l'induction de CHOP10 pourrait impliquer des médiateurs de nature non protéique.

En effet, si toutes les protéines ont été dénaturées, les 60 % d'induction restant pourraient être provoqués par des effecteurs nucléiques<sup>197</sup>, lipidiques<sup>198</sup>, des carbohydrates<sup>199</sup> ou autres<sup>200</sup>. Pour tester cette troisième hypothèse, nous pourrions tester séparément et en association différents traitements par des lipases, des nucléases et des saccharases.

## **2.5. Quantification de l'abondance de diverses cytokines connues pour être sécrétées par des macrophages infectés**

Nous avons montré qu'il existe un ou plusieurs médiateur(s) soluble(s) libérés dans les milieux de culture conditionnés par des cellules RAW264.7 infectées et susceptible(s) d'induire l'expression du gène codant pour CHOP10 dans des cellules naïves. Étant donné qu'au moins une partie de ces médiateurs semble être de nature protéique, nous avons décidé de quantifier l'abondance (relative) d'un ensemble de cytokines et chémokines connues pour être sécrétées par des macrophages infectés par divers pathogènes comme le TNF $\alpha$ <sup>201</sup> ou l'IFN $\beta$ <sup>195</sup>.

Cette liste non exhaustive de cytokines est reprise à la Figure 3.10.A. Pour des raisons pratiques, l'abondance protéique de 12 d'entre-elles (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MCP-1, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ ) a été quantifiée, par ELISA, dans les milieux conditionnés de macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*. Pour les autres cytokines, l'abondance de l'ARNm a été quantifiée en RT-qPCR en temps réel sur des extraits d'ARN total préparés à partir de macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*.



Parmi les seize cytokines analysées, huit sont sur-exprimées et/ou plus abondamment sécrétées par les macrophages exposés à *B. abortus* par rapport aux cellules contrôles. Il s'agit de l'IL-6, l'IL-10, le TNF $\alpha$ , l'IFN $\alpha$ , l'IFN $\beta$ , l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et CXCL-1.

Parmi ces huit cytokines différenciellement exprimées et/ou sécrétées par les macrophages exposés à la bactérie, certaines pourraient donc être des candidats intéressants susceptibles de conduire à l'expression de CHOP10.

Il est important de noter que l'expérience d'ELISA constituait une première approche permettant de passer en revue différentes cytokines qui pouvaient être différemment exprimées et/ou sécrétées par les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*. N'ayant aucune idée de la quantité de chaque cytokine présente dans les milieux de culture conditionnés, le test ELISA a été réalisé sur des milieux conditionnés non dilués. Cependant, dans ces conditions, la D.O. mesurée pour le TNF $\alpha$  était saturée. C'est la raison pour laquelle, les résultats obtenus pour TNF $\alpha$  ne sont pas normalisés par la quantité de protéines associée au tapis cellulaire. Cependant, il est évident que le TNF $\alpha$  est probablement produit de manière abondante par les macrophages RAW264.7 exposés à la bactérie et ce, très rapidement, puisque cette cytokine est déjà très abondante dans les milieux de culture conditionnés pour un temps de 10 h PI.

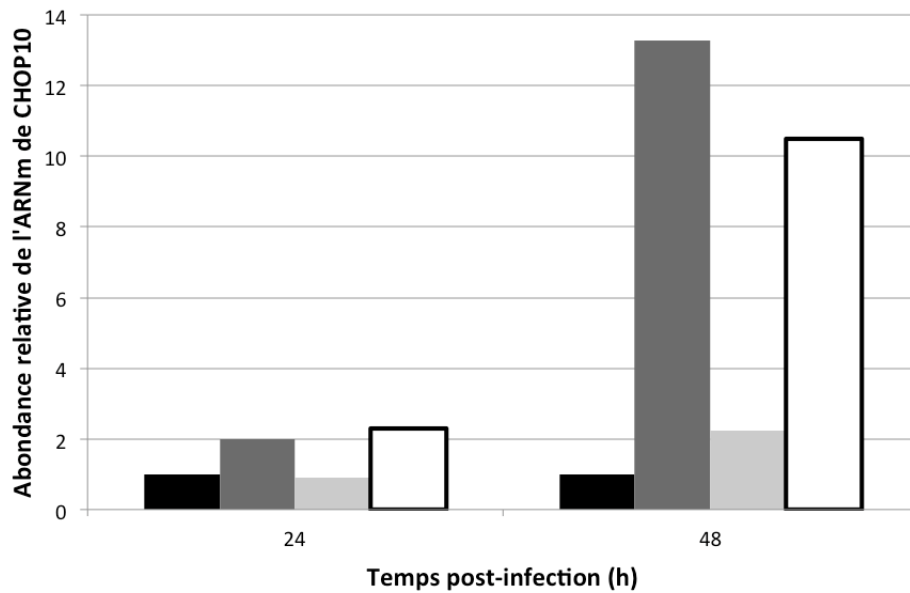
Maintenant que nous avons identifié différents effecteurs potentiels qui pourraient être impliqués dans la communication entre les cellules infectées et les cellules non infectées, nous pourrions recommencer une étude de l'analyse de l'abondance protéique de ces cytokines par ELISA, mais cette fois en testant différentes dilutions des milieux conditionnés afin d'éviter ce phénomène de saturation. De plus, nous devrions réaliser une courbe d'étalonnage pour chaque cytokine à l'aide de protéines recombinantes testées à des concentrations connues, pour pouvoir déterminer la concentration de chaque cytokine de manière quantitative et non de manière relative.

Afin de déterminer de manière rationnelle quelles cytokines méritaient d'être étudiées plus en détails, nous avons premièrement analysé la cinétique d'apparition des différentes cytokines. Nous avons identifié quatre cytokines dont l'abondance augmente au cours du temps et ce, avec un profil comparable à la cinétique d'apparition de CHOP10, c'est-à-dire, peu ou pas détectées à 5 h PI et retrouvées de manière plus abondante à 44 qu'à 20 h PI. Il s'agit de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6, l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$ .

En cherchant des informations relatives à ces différentes cytokines dans la littérature, nous avons écarté l'IL-1 $\beta$ . En effet, bien qu'un effet positif de l'IL-1 $\beta$  sur l'expression de CHOP10 ait déjà été rapporté dans la littérature<sup>202</sup>, le fait que la cinétique d'apparition est plus tardive que celle de CHOP10 suggère que l'IL-1 $\beta$  serait plus une conséquence de l'expression de CHOP10 plutôt que la cause. En effet, CHOP10 est connu pour induire la transcription de la caspase 11, une caspase responsable du clivage activateur de la caspase 1 qui, à son tour va pouvoir cliver et donc permettre la maturation de l'IL-1 $\beta$ <sup>203</sup>. L'accumulation de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus* permettrait donc la cascade de clivage conduisant à une augmentation de l'abondance protéique de IL-1 $\beta$  dans le milieu extracellulaire.

L'IL-10 est retrouvée de manière plus abondante à 20 h qu'à 10 et 44 h PI et présente donc un optimum de production au cours de l'infection. Le TNF $\alpha$  et KC sont déjà induits à 10 h PI. Etant donné que CHOP10 n'est pas exprimé avant 24 h PI, il est peut probable, mais pas exclu, que ces protéines soient responsables de l'induction de CHOP10.

Pour certaines cytokines quantifiées dans les milieux de culture conditionnés à l'aide du kit ELISA, nous avons également réalisé la quantification de l'ARNm dans les cellules infectées.



**Figure 3.11. Invalidation de CHOP10 à l'aide de siRNA dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus***

Des macrophages RAW264.7 ont étéensemencés dans des boîtes de culture à 12 puits à une densité de 50 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont été transfectées ou non (colonnes noires et gris foncé) ou avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de CHOP10 (colonne gris clair) ou avec des siRNA contrôles (colonnes blanches) (50 nM), à l'aide d'un vecteur de transfection chimique (HiPerFect). Après 24 h, les cellules ont été exposées (colonnes gris foncé, gris clair et blanche) ou non (colonnes noires) à *B. abortus* 2308 mCherry pendant une 1 h (MOI = 300), puis incubées dans du DHG-L1 contenant 10 % de SVFi supplémenté de 50 µg/ml de gentamycine. A 24 et 48 h PI, l'ARN total a été extrait et 5 µg ont été utilisés pour générer de l'ADNc par transcription inverse. L'abondance des transcrits a été mesurée par RT-qPCR en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques. Les résultats d'expression ont été calculés sur base de la méthode  $\Delta\Delta C_t$  avec HPRT utilisé comme un gène de référence. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'induction par rapport à l'abondance de l'ARNm de CHOP10 dans les cellules contrôles non transfectées (colonnes noires) (n=1).

Nous observons que pour trois d'entre-elles, l'IL-6, l'IL-10 et le TNF $\alpha$ , les profils d'expression au niveau du transcrit et de la protéine sont comparables, bien que les temps testés ne soient pas tout à fait identiques dans les deux conditions. L'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  semblent montrer des profils différents. L'apparition plus précoce de l'ARNm par rapport à la protéine suggère l'existence de mécanismes de régulation post-transcriptionnels régulant l'expression de ces protéines.

Précisons que malgré la variabilité importante des abondances mesurées pour une cytokine donnée entre les trois expériences indépendantes, le profil d'expression/sécrétion est resté inchangé. Nous suspectons que cette variabilité importante soit due au modèle expérimental employé. En effet, dans notre cas, la variabilité expérimentale peut résulter de la bactérie et de la cellule eucaryote.

Pour rechercher le rôle éventuel de ces cytokines dans l'induction de CHOP10, il serait donc pertinent de poursuivre ces études en recherchant l'implication potentielle de l'IL-1 $\alpha$ , IL-6, IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  dans l'induction de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*. Pour cela, il serait intéressant 1) d'analyser l'effet de l'invalidation de ces cytokines par des siRNA au cours de l'infection et/ou 2) de tester l'effet de l'addition d'anticorps neutralisants dans les milieux de culture conditionnés sur l'expression de CHOP10 par des cellules naïves incubées en présence de ces milieux. Une série d'expériences supplémentaires pourrait être réalisée en recherchant l'effet éventuel d'une stimulation des macrophages RAW264.7 par des cytokines recombinantes sur le niveau d'expression de *Ddit3*. Enfin, il est également envisageable que plusieurs cytokines participent à l'induction de l'expression de CHOP10 dans les cellules RAW264.7 exposées à *B. abortus*. Si cette hypothèse est vraie, nous devrions pouvoir inhiber l'expression du gène codant pour CHOP10 par une approche combinant ces interventions sur plusieurs cibles simultanément.

### **Partie 3 : Etude préliminaire visant à rechercher la ou les fonction(s) remplie(s) par CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus* : Mise au point de l'invalidation de CHOP10 à l'aide de siRNA**

Bien que le premier objectif de ce travail n'ait pas été complètement atteint, le second objectif de ce travail était d'étudier les fonctions remplies par CHOP10 dans des cellules exposées à *B. abortus*. Pour cela, il sera nécessaire de comparer les différents processus biologiques et réponses étudiés dans des conditions d'infection en présence ou en absence de la protéine CHOP10. Nous développerons les fonctions cellulaires qui mériteraient, selon nous, d'être analysées dans le cadre d'un travail ultérieur dans le chapitre relatif aux perspectives.

Un moyen pertinent pour tester le rôle de CHOP10 lors d'une infection des cellules serait de travailler sur des BMDM (*bone marrow derived macrophages*) provenant de souris invalidées (KO) pour le gène *Ddit3* et de comparer la réponse à l'exposition à *B. abortus* à celle obtenue pour des BMDM provenant de souris sauvages. Cependant, la purification quotidienne de cellules primaires est contraignante. Le travail sur ces macrophages en provenance de souris ayant différents backgrounds génétiques sera donc réservé à des expériences ponctuelles de confirmation. Il était donc important de mettre au point les conditions permettant l'invalidation de l'expression de CHOP10 (*knock down* ou silençage) dans les macrophages de la lignée RAW264.7. Nous avons donc réalisé les mises au point nécessaires à l'invalidation de CHOP10 à l'aide de siRNA afin de faciliter l'étude de la recherche de fonction de CHOP10 dans le cadre d'un travail ultérieur.





Nous avons donc transfecté les cellules RAW264.7 avec un siRNA dirigé contre l'ARNm de CHOP10 ou avec un siRNA contrôle négatif (RISC-free) qui n'est pas chargé par RISC afin de prendre en compte un éventuel effet de la transfection sur le processus biologique étudié. Ces cellules ont ensuite été exposées à *B. abortus* et le niveau d'expression de CHOP10 a été étudié en RT-qPCR en temps réel (Figure 3.11.). Dans ces conditions, nous montrons que le siRNA dirigé contre l'ARNm de *Ddit3* prévient bien l'augmentation de l'abondance du transcrit du gène cible induite par l'exposition des cellules à la bactérie (différence de plus de 80 %) alors que le siRNA contrôle n'induit qu'une légère diminution de l'abondance du transcrit codant pour CHOP10 (20 %).

Dans ces conditions, l'expression de CHOP10 dans les cellules transfectées avec des siRNA dirigés contre CHOP10 est comparable à celle observée dans les cellules contrôles, tandis que la transfection des cellules avec des siRNA contrôles ne modifie que légèrement l'abondance du transcrit du gène *Ddit3* déterminée dans des cellules RAW264.7 exposées à *B. abortus*.



## Conclusion et perspectives

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié l'impact d'une infection par *B. abortus* sur les macrophages RAW264.7 et plus particulièrement sur l'induction du facteur de transcription CHOP10.

Une étude menée précédemment au laboratoire avait pour but d'étudier l'effet de l'infection sur l'activation des différentes voies de signalisation de la réponse UPR. De manière surprenante, parmi les nombreux marqueurs analysés (niveau d'expression des gènes *HERP*, *BiP/GRP78*, *Ddit3/CHOP10*, l'abondance de la forme phosphorylée de eIF2 $\alpha$ , et l'activité du facteur de transcription XBP1s), seule l'induction de l'expression de CHOP10 a été identifiée comme étant une réponse des cellules RAW264.7 exposées à la bactérie. En effet, CHOP10 montre une dynamique d'expression qui est positivement corrélée au temps PI. Ces observations suggéraient que CHOP10 est induit indépendamment d'une activation de l'UPR. De plus, vu l'induction de l'expression de CHOP10 observée en réponse à l'infection, une analyse de sa localisation subcellulaire et du degré d'homogénéité de cette réponse au sein de la population cellulaire exposée à la bactérie avait été réalisée par des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale. Cette étude a montré que, pendant les 48 premières heures post-infection, CHOP10 est retrouvé dans le noyau des cellules qui ne contiennent pas la bactérie et ne sont donc pas infectées. Ces observations suggéraient alors une communication intercellulaire par des médiateurs solubles pour permettre aux cellules qui contiennent la bactérie d'induire l'expression de CHOP10, à distance, dans les cellules qui ne sont pas infectées (N. Lebailly, Mémoire 2011).

La première partie du mémoire visait à caractériser l'expression de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*. Pour cela, nous avons tout d'abord confirmé l'induction de CHOP10 au niveau protéique par une analyse de l'abondance du facteur en western blot dans des échantillons protéiques préparés à partir de macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*. De plus, nous avons complété ces informations montrant que l'abondance de l'ARNm du gène *Ddit3* est également plus importante dans les cellules répondant à la présence de *B. abortus* et ce, selon la même cinétique d'apparition. Ce résultat suggère donc que l'expression de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7 exposés à la bactérie pourrait être due à une régulation transcriptionnelle et/ou à une régulation post-transcriptionnelle.

Nous avons également confirmé et complété les marquages en immuno-fluorescence et les observations en microscopie confocale. Premièrement, le fait que CHOP10 soit localisé dans le noyau des cellules qui l'expriment suggère qu'il est potentiellement capable de lier l'ADN et donc susceptible de moduler l'expression de gènes cibles. En effet, nous avons montré que le niveau d'expression d'un des gènes cibles de CHOP10, GADD34 est parfaitement corrélé à l'induction de l'expression observée pour le facteur de transcription. Si cette observation n'est qu'une corrélation positive, elle suggère tout de même que CHOP10 est actif dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus*. Pour confirmer le lien causal entre l'augmentation de l'abondance de CHOP10 et l'expression de GADD34, bien établi<sup>87</sup>, nous pourrions analyser le niveau d'expression de GADD34 dans des cellules invalidées pour CHOP10 à l'aide de siRNA avant leur exposition à *Brucella*.

Deuxièmement, les observations réalisées en microscopie confocale sur des cellules RAW264.7 marquées en immunofluorescence pour le facteur de transcription a montré que CHOP10 est d'abord exprimé dans des cellules qui ne contiennent pas la bactérie et ce, jusque 48 h PI. En effet, à 72 h PI, l'ensemble des cellules exprime CHOP10, qu'elles soient



infectées ou non. L'expression de CHOP10 dans les cellules qui ne contiennent pas la bactérie peut être expliqué selon nous par deux modèles différents : l'hypothèse de contact selon laquelle un contact précoce entre la bactérie et la cellule eucaryote serait capable d'induire l'expression de CHOP10 de manière retardée et l'hypothèse de l'existence d'une communication intercellulaire selon laquelle les cellules infectées induisent la production de médiateurs capables d'induire la production de CHOP10 dans les cellules non infectées. Il semble que les résultats obtenus dans ce travail supportent le modèle de la communication intercellulaire, comme nous allons tenter de l'expliquer dans cette conclusion (Figure 4.1 A et B).

Nous avons également montré dans ce travail que l'expression de CHOP10 dans les macrophages en réponse à une exposition à *B. abortus* semble ne pas être un processus spécifique aux cellules RAW264.7 puisque nous avons montré, par un marquage en immunofluorescence, que celui-ci est également observé dans les cellules MEFs. Cependant, le pattern d'expression est différent puisque dans les cellules MEFs, CHOP10 est détecté dans les cellules qui contiennent la bactérie (48 h PI). Les raisons de cette différence sont encore inconnues à ce jour mais mériteraient d'être étudiées. De plus, il serait intéressant de compléter cette analyse en étudiant l'abondance de CHOP10 dans d'autres types cellulaires eucaryotes. Il serait par exemple intéressant de tester d'autres lignées de macrophages telles que les J774 ou encore d'autres types cellulaires connus pour être infectés lors d'une infection naturelle tels que des trophoblastes ou des cellules épithéliales. De même, nos résultats ayant été obtenus sur une lignée de cellules immortalisées, il serait intéressant de vérifier nos observations dans des lignées de macrophages primaires tels que les BMDM.

Nous avons également testé l'effet d'une autre espèce de *Brucella*, *B. melitensis*, sur l'induction de CHOP10 dans les macrophages RAW 264.7 exposés à la bactérie. Dans ces conditions, nous avons montré une induction de CHOP10 dans les macrophages exposés à *B. melitensis* qui est beaucoup plus faible que celle observée dans les cellules en réponse à *B. abortus*. Il semble donc que l'induction de CHOP10 dans les cellules infectées ne soit pas généralisable à l'ensemble des bactéries du genre *Brucella*. Les raisons de cette différence ne sont pas claires. Comme développé au point 5 des résultats, nous avons proposé deux hypothèses pour tenter de l'expliquer. Nous suggérons que la différence pourrait venir d'une différence dans le déroulement de l'infection ou d'une différence dans le génome même des deux espèces bactériennes. Il serait intéressant d'analyser l'induction de CHOP10 à d'autres temps PI afin de comparer les cinétiques d'induction de CHOP10 en réponse à l'exposition aux deux bactéries. De plus, il faudrait analyser d'autres souches de *B. melitensis* et d'autres souches de *B. abortus* afin de nous assurer que le phénotype n'est pas spécifique de celle-ci. Il serait également intéressant de compléter ces observations en testant d'autres souches de la bactérie telles que *B. suis* ou *B. ovis*, ou même d'autres genres bactériens comme par exemple *Legionella*, une autre bactérie intracellulaire se répliquant dans les RE<sup>204</sup>.

La deuxième partie du mémoire avait pour but de comprendre le mécanisme d'induction de CHOP10 dans les macrophages exposés à *B. abortus*.

Comme mentionné ci-dessus, l'étude réalisée précédemment au laboratoire suggérait que l'induction de CHOP10 est indépendante de la réponse UPR puisque, parmi les divers marqueurs testés, CHOP10 est le seul dont l'abondance augmente en réponse à l'exposition des macrophages à la bactérie (N. Lebailly, Mémoire 2011). De plus, le pattern d'expression de CHOP10 est difficilement compatible avec une réponse UPR. En effet, si CHOP10 était



induit à cause d'un stress du RE causé par la bactérie, on s'attendrait à ce qu'il soit rapidement exprimé dans les cellules infectées.

Il a été montré que dans le cadre de l'UPR, 3 facteurs de transcription (ATF6, ATF4 et XBP1) régulent la transcription de CHOP10<sup>87</sup>. Cependant, au début de ce travail, aucune information concernant l'abondance et/ou l'activité des facteurs de transcription ATF4 et ATF6 n'était disponible dans le cadre des macrophages exposés à *B. abortus*. Etant donné que le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  ne varie pas en réponse à l'infection, il est peut probable que l'abondance protéique d'ATF4, dont la traduction est induite par celui-ci<sup>192</sup>, varie dans ces conditions. Cependant, nous avons tout de même analysé l'abondance ou l'activité des facteurs ATF4 et ATF6 dans les cellules exposées à la bactérie. Nous montrons que l'abondance protéique d'ATF4 ne varie pas en réponse à l'infection. Notons que le niveau basal de l'abondance de cette protéine n'est pas nul. Il a été suggéré qu'en conditions basales ATF4 est séquestré par la ZIP kinase<sup>146</sup>. Or, dans le cadre d'une réponse UPR, c'est le niveau de traduction de ce facteur qui contrôle son abondance. Ce qui signifie que, même si le facteur est responsable de l'induction de CHOP10 dans ces conditions, il est peu probable que ce soit dans le cadre d'une réponse UPR. L'activité d'ATF6 a été mesurée à l'aide d'un système rapporteur. Comme expliqué au point 2.1. des résultats, ces résultats sont difficilement exploitables.

Un expérience permettant d'établir une implication d'ATF4 et/ou d'ATF6 dans la régulation transcriptionnelle de CHOP10 serait de réaliser une invalidation de l'expression de ces facteurs de transcription à l'aide de siRNA dirigés contre les transcrits de ces facteurs de transcription dans des cellules exposées à *B. abortus* et ensuite analyser par RT-qPCR en temps réel, la quantité d'ARNm de CHOP10 en présence et en absence de l'expression de ces facteurs.

De plus, si l'induction de CHOP10 dépend effectivement de ces facteurs de transcription, il faudrait approfondir pour savoir dans par quelle voie de signalisation ceux-ci sont induits. En effet, ATF4 peut être induit par des différents mécanismes indépendant de l'UPR comme par exemple lors de la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  qui lui même peut être phosphorylé par 4 kinases différentes (PERK, GCN2 (*general control nonrepressible-2*), HRI (*heme-regulated inhibitor*) et PKR (*double-stranded RNA-induced protein kinase*)) selon les conditions rencontrées telles que par exemple en réponse à l'activation des MAPK<sup>205</sup>.

Nous avons également développé au point 3.3.1. de l'introduction que CHOP10 pouvait être induit par d'autres facteurs de transcription de la famille des ATF<sup>139,142,143,147</sup>, des C/EBP<sup>137</sup> ou encore par les facteurs AP-1<sup>143</sup> et ce dans des conditions qui peuvent être indépendantes de l'UPR. Dans le futur il serait intéressant d'invalidier l'expression de ces facteurs de transcription à l'aide de siRNA afin d'analyser leur implication potentielle dans l'induction de CHOP10 en réponse à l'exposition à *B. abortus*.

Nous avons également voulu déterminer si l'induction de CHOP10 dans les cellules RAW264.7 dépend d'un processus actif ou passif de la bactérie. En effet, il a été montré qu'une incubation de LPS soluble d'*E. coli* est capable d'induire, dans des macrophages, l'expression de CHOP10 et ce, de manière retardée par rapport à l'expression de CHOP10 induite par la TG lors de l'activation d'une UPR<sup>168</sup>. Ce processus aurait pu éventuellement expliquer l'induction de CHOP10 retrouvée à 72 h PI dans l'ensemble des cellules en réponse à un contact entre le LPS de *Brucella* et la cellule hôte eucaryote.

Cependant, différents éléments suggèrent que cette hypothèse est peu probable. En effet, premièrement, le LPS de *Brucella* est beaucoup moins endotoxique que celui d'*E. coli*<sup>194</sup>. En effet, il ne lie que faiblement le TLR4 à cause de la structure non canonique de son lipide A<sup>194</sup>. Soulignons de plus que l'expérience citée ci-dessus utilisait du LPS soluble. En effet, il paraît pertinent de suspecter que le LPS soluble n'a pas des propriétés identiques au LPS





porté par une bactérie, comme dans le cadre des infections que nous avons réalisées. Deuxièmement, dans l'étude rapportée pour la stimulation des cellules par le LPS soluble de *E. coli*, d'autres marqueurs de la réponse UPR sont détectés à des temps plus précoces<sup>168</sup> alors que l'activation de tels marqueurs n'a pas pu être mise en évidence dans les macrophages exposés à *Brucella* (Nicolas Lebailly, Mémoire 2011). Enfin, l'induction de l'expression de CHOP10 est de plus en plus importante au cours du temps d'incubation post-infection et est donc corrélée à l'augmentation de la charge bactérienne suite à la réplication de la bactérie qui se déroule au cours du temps PI. Cette observation laisse penser qu'un processus actif nécessitant une bactérie vivante qui se réplique et non la simple phagocytose de bactéries mortes est nécessaire à l'induction de l'expression du gène *Ddit3* dans les macrophages exposés à la bactérie.

Dans ce travail, nous avons montré que l'induction de CHOP10 est un processus qui nécessite la présence de bactéries vivantes. De plus, il semble que ce processus actif soit médié par un (des) effecteur(s) transloqué(s) par le T4SS puisque des bactéries délétées pour l'opéron *virB* codant pour le T4SS sont incapables d'induire l'expression de CHOP10 dans les macrophages RAW264.7. Malheureusement, bien que l'importance de T4SS de *Brucella* dans la virulence de la bactérie soit clairement établie, les mécanismes par lesquels les effecteurs assurent leur fonction sont méconnus. En effet, différents effecteurs sont identifiés, mais à ce jour, seulement deux d'entre eux ont une fonction associée. Il s'agit de Btp1<sup>74</sup>, connu pour moduler les voies de signalisation en aval des TLR et RicA<sup>40</sup>, un effecteur interagissant avec Rab2 et modulant ainsi le trafic intracellulaire de la BCV (Les mécanismes d'action sont détaillés aux points 1.4.2. et 1.3.3. de l'introduction).

Cependant, pour confirmer que le phénotype observé (absence d'induction de CHOP10 en réponse au mutant  $\Delta virB$ ) est du à l'absence de l'opéron *virB* et non pas à une autre mutation qui se trouverait ailleurs dans le génome, il faudrait réaliser une expérience de « rescue ». C'est à dire une infection avec la souche *B. abortus*  $\Delta virB$  dans laquelle on aurait préalablement réintroduit un plasmide encodant l'opéron *virB* sous le contrôle de son promoteur. Si l'absence d'induction de CHOP10 dans les cellules exposées à *B. abortus* est bien due à l'absence de l'opéron, dans l'expérience de « rescue », l'induction de CHOP10 devrait être comparable à celle obtenue lors d'une infection par la souche *B. abortus* sauvage.

Nous avons mis en évidence que des facteurs solubles contenus dans les milieux conditionnés de macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus* sont capables d'induire l'expression de CHOP10 dans des macrophages RAW264.7 naïfs, ce qui supporte l'hypothèse de la communication intercellulaire.

Une étude parue en 2009 a montré, dans un modèle de macrophages RAW264.7 infectés par *B. abortus*, que les cellules infectées induisaient, dans les cellules voisines non infectées, l'expression de *Irgm3* et ce, par la sécrétion d'IFN de type I<sup>195</sup>.

Nous avons donc voulu analyser l'implication potentielle de facteurs solubles de nature protéique présents dans les milieux de culture conditionnés de macrophages exposés à la bactérie dans l'induction de l'expression de CHOP10. Etant donné que pour des raisons inconnues, les cellules ne supportent pas l'incubation en présence de milieux de culture conditionnés incubés à 100 °C, nous avons réalisé l'expérience avec des milieux conditionnés incubés à 80°C. Nous avons néanmoins pu montrer que l'induction de CHOP10 est, au moins en partie, sensible au chauffage du milieu conditionné et donc probablement aux facteurs protéiques contenus dans ces milieux de culture conditionnés.

Dès lors, nous avons réalisé une recherche bibliographique afin de recenser un maximum de cytokines connues pour être sécrétées par les macrophages infectés. Nous avons alors



constitué une liste de 16 cytokines que nous avons quantifiées au niveau de l'abondance de l'ARNm (en RT-qPCR) dans les cellules exposées à la bactérie et/ou au niveau de l'abondance protéique dans les milieux de culture conditionnés (par des tests ELISA). Parmi les 16 cytokines testées, nous avons mis en évidence une augmentation de l'abondance/l'expression de 8 d'entre elles en réponse à l'exposition de la bactérie. Ensuite, sur base de leur cinétique de sécrétion ou d'expression, nous avons sélectionné 4 cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ) dont la cinétique d'apparition est comparable à celle de CHOP10.

Comme perspective à ce travail, il serait intéressant d'invalider l'expression de ces cytokines par transfection de siRNA dans des cellules qui seraient ensuite exposées à la bactérie ou de neutraliser l'effet biologique de ces cytokines dans les milieux de culture conditionnés en présence d'anticorps neutralisants. Une fois ces cytokines invalidées ou neutralisées (séparément ou ensemble), nous pourrions tester l'effet de milieux de culture conditionnés sur l'expression de CHOP10 dans des cellules naïves.

De plus, rappelons que nous ne pouvons pas affirmer que l'induction de CHOP10 est due entièrement à un ou plusieurs facteurs protéiques. Il se pourrait donc aussi que l'induction partielle du gène *Ddit3* encore observée après l'invalidation de la cytokine soit générée en réponse à un médiateur de nature non protéique. En effet,

De plus, une expérience complémentaire permettant de confirmer l'implication d'une ou de plusieurs cytokine(s) donnée(s) dans l'expression de CHOP10 pourrait être envisagée en testant l'effet d'une stimulation de cellules RAW264.7 à l'aide de cette/ces cytokine(s) recombinante(s).

Cependant, bien que nous ayons montré que l'induction de CHOP10 est générée par un mécanisme de communication intercellulaire, il reste à découvrir comment *B. abortus* induit la production de ces médiateurs solubles par les cellules qu'elle infecte et comment ces cytokines vont pouvoir induire l'expression de CHOP10 dans les cellules non infectées.

En effet, dans le cadre de ce modèle d'infection expérimentale, deux questions subsistent. Premièrement, quelle(s) sont les voies de signalisation activées par *Brucella* responsables de la production de cytokines dans les cellules infectées ? Deuxièmement, par quel(s) mécanisme(s) les cytokines vont-elles induire la transcription de CHOP10 ?

Pour tenter de déterminer les processus biologiques perturbés par la présence de la bactérie, et donc susceptibles d'être responsables de l'induction d'une réponse cellulaire nous avons analysé les résultats d'une étude transcriptomique portant sur l'impact d'une infection par *B. abortus* sur les macrophages RAW 264.7<sup>41</sup>. Les résultats de cette étude montrent qu'une série de gènes impliqués dans chaîne de transport d'électrons mitochondriale sont sous-exprimés dans les cellules infectées par rapport aux cellules contrôles, suggérant un stress mitochondrial dans ces cellules<sup>41</sup>. De plus, il a été montré très récemment qu'un dysfonctionnement mitochondrial est responsable de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ <sup>206</sup>, cytokines qui s'accumulent dans les milieux conditionnés de cellules infectées par *B. abortus*.

De même, il a été montré récemment que lors d'une infection de cellules HeLa par *Listeria monocytogenes*, on observe une augmentation de la fission du réseau mitochondrial via une toxine sécrétée appelée LLO (*Listeriolysin O*). Or, la morphologie de ce réseau est associée à sa fonctionnalité. En effet, on remarque une perte du potentiel de membrane et une diminution de la production d'ATP dans les cellules infectées<sup>207</sup>. Enfin, il est connu que l'infection de macrophages par différents pathogènes intracellulaires induit la production de ROS mitochondriaux (mtROS) par une voie qui dépend des TLR 1, 2 et 4<sup>208</sup>. Il a été montré que



dans les myocytes et neutrophiles de patients atteints du syndrome TRAPS (*TNFR1-associated periodic syndrome*), l'accumulation de mtROS induit l'activation de MAPK comme JNK1 et p38, qui vont à leur tour induire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 par l'intermédiaire des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B<sup>209</sup>.

Nous proposons donc que *Brucella*, pourrait induire un stress de la mitochondrie dans les cellules infectées, qui à son tour conduira à l'accumulation de cytokines dans le milieu extracellulaire. Ces cytokines pourraient alors directement ou indirectement induire l'expression de CHOP10. Pour vérifier cette hypothèse, nous proposons de quantifier la production de ROS dans les cellules infectées à l'aide d'une sonde fluorescente et spécifique comme la sonde MitoSox permettant de mesurer la production de radicaux anioniques superoxydes dans les mitochondries.

Ensuite, très peu d'information existe sur l'induction de CHOP10 par les différentes cytokines. Nous avons cependant trouvé qu'une incubation des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, productrices d'insuline, avec un cocktail d'IL-1 $\beta$  et d'IFN $\gamma$  (cytokines retrouvées dans les milieux conditionnés des cellules infectées par *B. abortus*.) conduit à l'expression de CHOP10 d'une manière indépendante de l'activation de l'UPR. Ces auteurs montrent que l'expression de CHOP10 dans ces conditions est médiée par les facteurs de transcription AP-1 et ATF4<sup>143</sup>.

De plus, les médiateurs solubles produits par les cellules infectées étant sécrétés dans le milieu extracellulaire, il reste à expliquer pourquoi CHOP10 n'est pas exprimé avec la même cinétique dans les cellules qui contiennent la bactérie et dans celles qui ne la contiennent pas. Cette observation suggère que la bactérie serait capable d'inhiber l'expression de CHOP10 dans la cellule infectée, au moins jusqu'à 48 h PI. Comme mentionné dans l'introduction (voir Boîte 2), le T4SS encodé par *virB* de *Brucella* est primordial pour la capacité d'infection de la bactérie. La sécrétion d'effecteurs est donc un mécanisme potentiel par lequel la bactérie pour moduler les fonctions cellulaires de son hôte. Certains de ces effecteurs pourraient inhiber la production de CHOP10. Cependant, étant donné que l'expression de l'opéron *virB* semble nécessaire à l'induction de CHOP10 lui-même, il n'est pas possible de tester la localisation de CHOP10 par immunofluorescence lors d'une infection par le mutant  $\Delta virB$ . Une méthode fastidieuse, mais très informative, serait d'étudier le pattern d'expression de CHOP10 en réponse à différents mutants d'une banque de bactéries mutées par transposition aléatoire par exemple.

Une troisième partie de ce mémoire consistait à préparer les outils nécessaires à l'étude des fonctions remplies par CHOP10 dans des cellules exposées à *B. abortus*. Pour analyser l'implication de CHOP10 dans les différents processus cellulaires qui pourraient être étudiés (voir ci-dessous), il est nécessaire de posséder un modèle cellulaire dans lequel CHOP10 est invalidé et ce, afin de pouvoir comparer les différents marqueurs analysés dans les deux conditions. A plus long terme, il serait également intéressant de confirmer certains résultats clés sur des macrophages primaires provenant de moelle osseuse de souris. Etant donné que des souris KO pour CHOP10 sont disponibles commercialement (Jackson Laboratory), les différents processus étudiés pourraient être comparés dans des BMDM provenant de souris sauvages ou de souris CHOP10<sup>-/-</sup>.

Dans ce travail, nous avons mis au point l'invalidation de l'expression de CHOP10 dans les cellules RAW264.7 à l'aide de siRNA spécifiques de la protéine.

Maintenant que ce modèle est mis au point, différents processus cellulaires mériteraient d'être étudiés dans les macrophages RAW264.7 exposés à *B. abortus* et invalidés ou non pour l'expression de CHOP10.



Parmi ceux-ci, reprenons les quatre qui ont retenu notre attention : 1) la modulation de l'infectivité/capacité infectieuse ? de *B. abortus*, 2) la modulation de l'apoptose, 3) la modulation de la voie de signalisation des Wnts et 4) la régulation éventuelle de l'expression de certains miRNA.

Premièrement, quel(s) que soi(en)t la (les) fonctions cellulaires dans lesquelles CHOP10 est impliqué, il est pertinent de se demander si son expression est bénéfique, délétère ou neutre pour la bactérie. Pour cela, deux paramètres peuvent être étudiés. Tout d'abord, l'effet qu'exerce CHOP10 sur la réplication bactérienne. Pour cela, nous pourrions analyser la quantité de bactéries présente par cellule infectée lorsque CHOP10 est présent ou non. Il faudrait donc se positionner à un temps PI pour lequel CHOP10 est exprimé dans les cellules qui contiennent la bactérie, c'est-à-dire, à 72 h PI. Nous pourrions donc envisager d'utiliser une méthode de cytométrie de flux afin de quantifier le signal de fluorescence associé à la mCherry dans une cellule dans les conditions où CHOP10 est invalidé ou non.

Un autre paramètre à analyser serait la susceptibilité des cellules eucaryotes à l'infection selon qu'elles soient CHOP10 positives ou négatives. Etant donné le modèle d'infection utilisé, il est impossible d'estimer la susceptibilité des cellules lors d'une seule infection. En effet, le milieu de culture est supplémenté avec de la gentamycine afin de synchroniser l'infection. Lorsqu'une bactérie quitte sa cellule hôte, il lui est donc impossible de ré-infecter une seconde cellule. Une expérience qui permettrait de déterminer la susceptibilité des cellules eucaryotes à l'infection en présence ou non de CHOP10 consiste à réaliser une double infection. En effet, en réalisant une première infection avec une souche sauvage, on induirait l'expression de CHOP10 en premier lieu dans les cellules non infectées. En se positionnant à un temps PI situé entre 24 et 48 h PI, il serait alors possible d'obtenir une population cellulaire dans laquelle environ 50 % des cellules non infectées seraient CHOP10 positives. La seconde infection serait alors réalisée à l'aide de la souche mCherry. En analysant, 24 h plus tard, par marquage en immunofluorescence et cytométrie de flux, la localisation des bactéries provenant de la deuxième infection, nous pourrions déterminer si les cellules CHOP10 positives sont plus ou moins infectées que les cellules CHOP10 négatives.

Deuxièmement, comme développé au point 3.4.1. de l'introduction, CHOP10 est souvent associé à un phénomène apoptotique. Bien qu'il soit souvent considéré comme un régulateur positif de celle-ci<sup>151-155</sup>, dans certaines conditions CHOP10 semble inhiber l'apoptose<sup>170</sup>. Si les souches lisses de *B. abortus* sont connues pour inhiber l'apoptose des macrophages qu'elles infectent, les souches rugueuses (ex : RB51) quant à elles induisent la mort cellulaire programmée<sup>210</sup>.

Tout d'abord, nous analyserions l'abondance de marqueurs de l'apoptose tels que l'activation des caspases et la fragmentation de l'ADN. Ensuite il serait intéressant d'analyser des marqueurs connus pour être régulés par CHOP10 en conditions d'apoptose tels que Bcl-2, Bim, TRB3 et DR5 la concentration en glutathion ou encore la production de ROS<sup>157-159,211-214</sup>. Nous pourrions analyser l'effet de CHOP10 qu'a sur ces marqueurs dans le cadre d'une apoptose induite par une infection par la souche rugueuse RB51.

Troisièmement, nous avons vu que CHOP10 est également capable d'inhiber la transcription de gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -cat en interagissant avec TCF, le facteur de transcription en aval de cette voie et ce, en inhibant sa liaison à l'ADN<sup>128</sup>.

Il a été montré récemment que la voie Wnt/ $\beta$ -cat est impliquée dans la réponse cellulaire des macrophages infectés par *M. tuberculosis* puisqu'elle induit l'expression de IL-12 et de l'IFN $\gamma$ <sup>215</sup>. De plus, cette voie de signalisation est impliquée dans la formation de granulomes



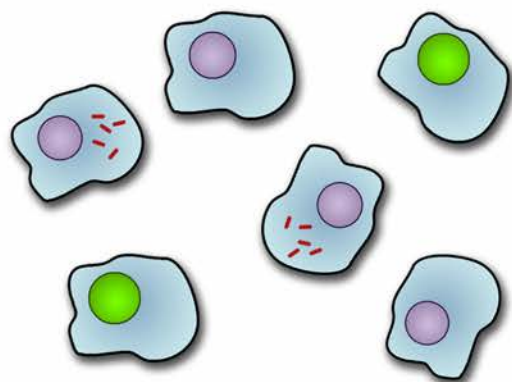
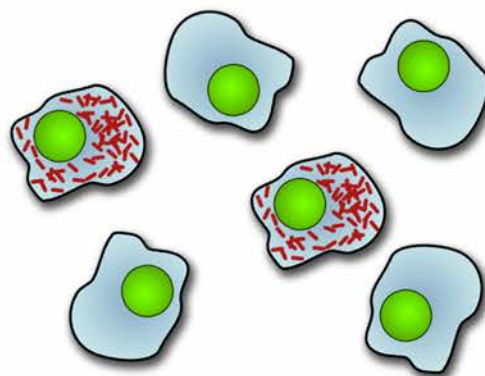
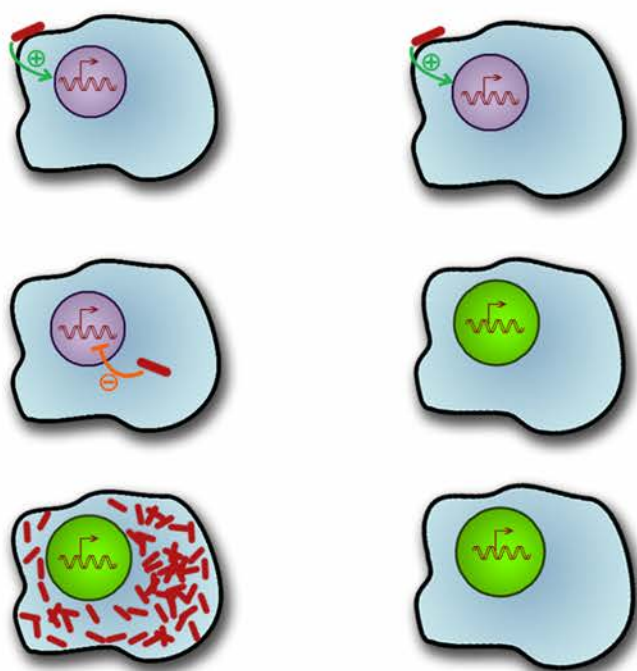
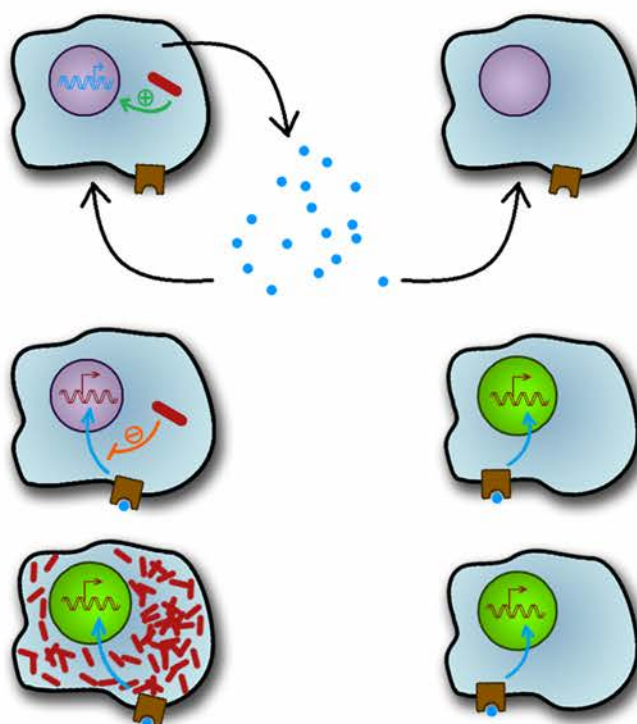


dans le cadre d'une infection par *M. tuberculosis*<sup>216</sup>. L'analyse de l'implication de CHOP10 dans la modulation de la voie Wnt/TCF dans le cadre d'une infection par *B. abortus* pourrait être analysée de la manière suivante. Premièrement, une co-immunoprécipitation permettrait de déterminer si CHOP10 interagit ou non avec TCF dans nos conditions expérimentales. Dans un deuxième temps, s'il s'avère que c'est le cas, nous pourrions analyser l'activité du facteur TCF à l'aide d'un système rapporteur luciférase<sup>217</sup> dans des cellules invalidées ou non pour CHOP10, infectées par *B. abortus*. De plus, étant donné qu'une infection par *Brucella* induit également la formation de granulomes<sup>218</sup> lors d'une infection *in vivo*, nous pourrions réaliser des coupes histologiques d'organes infectés par *B. abortus* et étudier la présence de CHOP10 dans les granulomes par marquage. Ensuite, si CHOP10 est également exprimé dans les granulomes induits par l'infection par *B. abortus*, nous pourrions réaliser l'expérience mais cette fois en parallèle dans des souris sauvages et CHOP10<sup>-/-</sup>, afin d'analyser si l'expression de CHOP10 est impliquée dans la formation de ceux-ci.

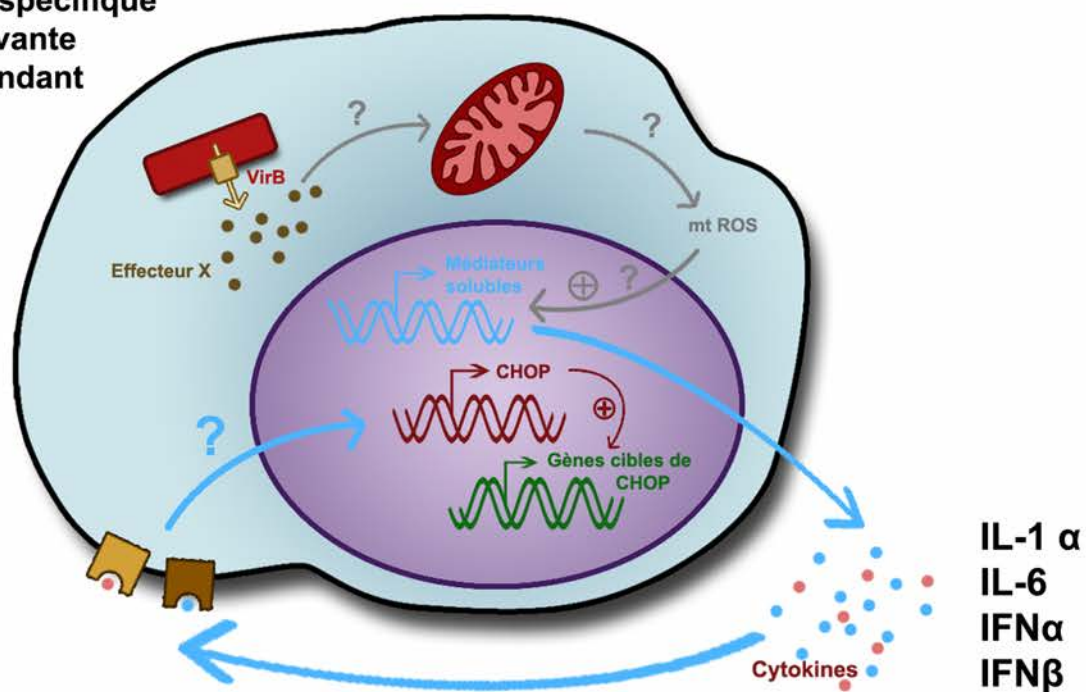
Enfin, la découverte des miRNA apporte un niveau de complexité supplémentaire à l'ensemble des processus biologiques connus, y compris aux relations hôtes pathogènes. En effet, une revue récente souligne les nombreux miRNA connus à ce jour pour la signalisation en aval des différents TLR, récepteurs capitaux pour la détection des pathogènes<sup>179</sup>. Il a été montré que CHOP10 est capable de moduler un miRNA (miR-708) dans le cadre de la réponse UPR<sup>182</sup>. Il serait intéressant d'étudier l'implication des miRNA dans le cadre d'une infection par *Brucella*. Aucune étude n'est encore publiée à ce sujet. Pour cela, nous réaliserions un profil des miRNA par un TaqMan Rodent MicroRNA Array qui permet l'analyse de 661 miRNA actuellement identifiés chez la souris. En comparant les résultats obtenus dans des macrophages infectés provenant de souris contrôles et de souris KO pour CHOP10, il sera potentiellement possible d'identifier des miRNA régulés directement ou indirectement par CHOP10. Une fois identifié, ils pourraient faire l'objet d'une étude plus approfondie, afin de déterminer les mécanismes par lesquels ils sont régulés ainsi que les ARNm qu'ils ciblent en cours d'infection.

Les quatre processus biologiques décrits ci-dessus sont des processus pour lesquels l'implication de CHOP10 a déjà été montrée dans d'autres conditions expérimentales. Cependant, une étude *in silico* a montré que 3522 gènes possèdent, dans leur promoteur, la séquence consensus de liaison à l'ADN de CHOP10<sup>126</sup>. Les gènes régulés par CHOP10 dépendent donc fortement des conditions physio-pathologiques dans lesquelles il est activé. Pour identifier des gènes différentiellement régulés par CHOP10 dans le cadre de l'infection de macrophages par *Brucella*, il serait intéressant de réaliser une expérience de ChIP on chip<sup>219</sup> ou de ChIP-Seq<sup>220</sup> dans les macrophages exposés à *B. abortus*. Cette approche permettrait d'identifier, dans une approche sans a priori, des gènes différentiellement régulés par CHOP10 lors de l'infection des macrophages par la bactérie.

Ce travail a donc permis d'apporter des éléments nouveaux permettant une meilleure compréhension de la relation qui existe en *B. abortus* et la cellule hôte de type phagocytaire, et les mécanismes responsables de l'induction de CHOP10 en conditions d'infection (Figure 4.1.).

**A****24-48 h PI****72 h PI****B****Modèle 1 : Contact****Modèle 2 : Communication intercellulaire****C**

*B. abortus* spécifique  
Bactérie vivante  
T4SS-dépendant



#### **Figure 4.1. Récapitulatif des principales données obtenues lors du mémoire**

##### **A. Schéma des différents patterns d'expression de CHOP10 dans les macrophages exposés à *B. abortus*.**

A 24 et 48 h PI, CHOP10 (représenté en vert) est exclusivement retrouvé dans le noyau des cellules qui ne contiennent pas la bactérie (représentée en rouge). Par contre, à 72 h PI, le facteur de transcription est retrouvé dans l'ensemble des cellules, qu'elles soient infectées ou non.

##### **B. Modèles proposés pour expliquer ce pattern d'expression.**

Le premier modèle suppose qu'un contact précoce entre la bactérie et la cellule hôte permet d'induire l'expression de CHOP10 de manière retardée dans l'ensemble des cellules, que la bactérie finisse par y pénétrer ou non.

Le second modèle repose sur une communication intercellulaire. En effet, la bactérie induirait la production de cytokines par les cellules infectées. Ces cytokines, une fois dans le milieu extracellulaire, pourraient induire l'expression de CHOP10 par l'ensemble des cellules, infectées ou non.

Ces deux modèles impliquent un mécanisme d'inhibition de la production de CHOP10 par la bactérie dans les cellules infectées aux temps précoces.

##### **C. Données expérimentales en faveur du modèle de communication intercellulaire.**

Nous avons montré que l'induction de CHOP10 nécessite la présence de bactéries vivantes et semble dépendante du T4SS de la bactérie.

Nous avons également montré que ces médiateurs sont, au moins en partie, de nature protéique, et capables d'induire l'expression de CHOP10 dans des cellules naïves. Nous avons identifié IL-1 $\alpha$ , l'IL-6, l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$  comme des candidats potentiellement intéressants pour agir comme des médiateurs solubles susceptibles d'induire l'expression de CHOP10.

Enfin, des données de la littérature suggèrent que le mécanisme d'induction des médiateurs solubles pourrait être associé à un dysfonctionnement mitochondrial et à la production de mtROS.



## 1. Bibliographie associée au texte

- 1 Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. & Akritidis, N. Brucella as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2229-2236, doi:10.1007/s00018-006-6311-4 (2006).
- 2 Fugier, E., Pappas, G. & Gorvel, J. P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. *Expert Rev Mol Med* **9**, 1-10, doi:10.1017/S1462399407000543 (2007).
- 3 Corbel, M. J. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* **3**, 213-221 (1997).
- 4 Gorvel, J. P. Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect* **10**, 1010-1013, doi:10.1016/j.micinf.2008.07.007 (2008).
- 5 Nicoletti, P. Vaccination against Brucella. *Adv Biotechnol Processes* **13**, 147-168 (1990).
- 6 Ackermann, M. R., Cheville, N. F. & Deyoe, B. L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of Brucella abortus strain 19. *Vet Pathol* **25**, 28-35 (1988).
- 7 Anderson, T. D., Cheville, N. F. & Meador, V. P. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with Brucella abortus. II. Ultrastructural studies. *Vet Pathol* **23**, 227-239 (1986).
- 8 Anderson, T. D., Meador, V. P. & Cheville, N. F. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with Brucella abortus. I. Gross and histologic lesions. *Vet Pathol* **23**, 219-226 (1986).
- 9 Meador, V. P. & Deyoe, B. L. Intracellular localization of Brucella abortus in bovine placenta. *Vet Pathol* **26**, 513-515 (1989).
- 10 Meador, V. P., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. Pathogenesis of Brucella abortus infection of the mammary gland and supramammary lymph node of the goat. *Vet Pathol* **26**, 357-368 (1989).
- 11 Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P. & Nakoinz, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**, 261-267 (1978).
- 12 Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. & Liautard, J. P. Role of the Brucella suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* **71**, 1481-1490 (2003).
- 13 Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J. P. & Dornand, J. In vitro Brucella suis infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* **68**, 342-351 (2000).
- 14 Harmon, B. G., Adams, L. G. & Frey, M. Survival of rough and smooth strains of Brucella abortus in bovine mammary gland macrophages. *Am J Vet Res* **49**, 1092-1097 (1988).
- 15 Harmon, B. G., Adams, L. G., Templeton, J. W. & Smith, R., 3rd. Macrophage function in mammary glands of Brucella abortus-infected cows and cows that resisted infection after inoculation of Brucella abortus. *Am J Vet Res* **50**, 459-465 (1989).
- 16 Bellaire, B. H., Roop, R. M., 2nd & Cardelli, J. A. Opsonized virulent Brucella abortus replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infect Immun* **73**, 3702-3713, doi:10.1128/IAI.73.6.3702-3713.2005 (2005).
- 17 Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K. & Shirahata, T. Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**, 341-355 (2002).



- 18 Kim, S. *et al.* Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb Pathog* **37**, 11-19, doi:10.1016/j.micpath.2004.04.002 (2004).
- 19 Dettloux, P. G., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in Vero cells. *Am J Vet Res* **52**, 1658-1664 (1991).
- 20 Guzman-Verri, C. *et al.* GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* **276**, 44435-44443, doi:10.1074/jbc.M105606200 (2001).
- 21 Gorvel, J. P. & Moreno, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**, 281-297 (2002).
- 22 Tran Van Nhieu, G., Bourdet-Sicard, R., Dumenil, G., Blocker, A. & Sansonetti, P. J. Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol* **2**, 187-193 (2000).
- 23 Lopez-Goni, I. *et al.* Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* **90**, 329-339 (2002).
- 24 Celli, J. *et al.* *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545-556, doi:10.1084/jem.20030088 (2003).
- 25 Pizarro-Cerda, J. *et al.* *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* **66**, 5711-5724 (1998).
- 26 Rittig, M. G., Alvarez-Martinez, M. T., Porte, F., Liautard, J. P. & Rouot, B. Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun* **69**, 3995-4006, doi:10.1128/IAI.69.6.3995-4006.2001 (2001).
- 27 Celli, J., Salcedo, S. P. & Gorvel, J. P. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1673-1678, doi:10.1073/pnas.0406873102 (2005).
- 28 Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect* **2**, 829-835 (2000).
- 29 Commerci, D. J., Martinez-Lorenzo, M. J., Sieira, R., Gorvel, J. P. & Ugalde, R. A. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* **3**, 159-168 (2001).
- 30 Arenas, G. N., Staskevich, A. S., Aballay, A. & Mayorga, L. S. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* **68**, 4255-4263 (2000).
- 31 Drecktrah, D., Knodler, L. A., Howe, D. & Steele-Mortimer, O. Salmonella trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic* **8**, 212-225, doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00529.x (2007).
- 32 Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A. & Celli, J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **9**, 678-694, doi:TRA718 [pii] 10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x (2008).
- 33 Huynh, K. K. & Grinstein, S. Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 452-462, doi:10.1128/MMBR.00003-07 (2007).
- 34 Porte, F., Liautard, J. P. & Kohler, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**, 4041-4047 (1999).





- 35 Delrue, R. M., Lestrade, P., Tibor, A., Letesson, J. J. & De Bolle, X. Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett* **231**, 1-12 (2004).
- 36 Boschirolì, M. L. *et al.* Type IV secretion and Brucella virulence. *Vet Microbiol* **90**, 341-348 (2002).
- 37 Sieira, R., Comerci, D. J., Pietrasanta, L. I. & Ugalde, R. A. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the Brucella abortus virB operon. *Mol Microbiol* **54**, 808-822, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04316.x (2004).
- 38 Gruenberg, J. & van der Goot, F. G. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 495-504, doi:10.1038/nrm1959 (2006).
- 39 Fugier, E. *et al.* The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for Brucella replication. *PLoS Pathog* **5**, e1000487, doi:10.1371/journal.ppat.1000487 (2009).
- 40 de Barsy, M. *et al.* Identification of a Brucella spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cell Microbiol* **13**, 1044-1058, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01601.x (2011).
- 41 Eskra, L., Mathison, A. & Splitter, G. Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with Brucella abortus. *Infect Immun* **71**, 1125-1133 (2003).
- 42 Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13 (1989).
- 43 Medzhitov, R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* **30**, 766-775, doi:10.1016/j.immuni.2009.06.004 (2009).
- 44 Radtke, A. L. & O'Riordan, M. X. Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol* **8**, 1720-1729, doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00795.x (2006).
- 45 Rus, H., Cudrici, C. & Niculescu, F. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res* **33**, 103-112, doi:10.1385/IR:33:2:103 (2005).
- 46 Langermans, J. A., Hazenbos, W. L. & van Furth, R. Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods* **174**, 185-194 (1994).
- 47 Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**, 663-700, doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.003311 (1986).
- 48 Kinchen, J. M. & Ravichandran, K. S. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 781-795, doi:10.1038/nrm2515 (2008).
- 49 Nauseef, W. M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol* **122**, 277-291, doi:10.1007/s00418-004-0679-8 (2004).
- 50 Chakravorty, D. & Hensel, M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect* **5**, 621-627 (2003).
- 51 Cape, J. L. & Hurst, J. K. The role of nitrite ion in phagocyte function--perspectives and puzzles. *Arch Biochem Biophys* **484**, 190-196 (2009).
- 52 Obita, T., Ueda, T. & Imoto, T. Solution structure and activity of mouse lysozyme M. *Cell Mol Life Sci* **60**, 176-184 (2003).
- 53 Hsing, L. C. & Rudensky, A. Y. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* **207**, 229-241, doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x (2005).
- 54 Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753-766, doi:10.1016/j.cell.2004.11.038 (2004).



- 55 Schmid, D. & Munz, C. Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1519-1527, doi:10.1038/sj.cdd.4401727 (2005).
- 56 Baldwin, C. L. & Goenka, R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol* **26**, 407-442 (2006).
- 57 Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793, doi:10.1038/383787a0 (1996).
- 58 Grewal, I. S. & Flavell, R. A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* **16**, 111-135, doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.111 (1998).
- 59 Radoja, S., Frey, A. B. & Vukmanovic, S. T-cell receptor signaling events triggering granule exocytosis. *Crit Rev Immunol* **26**, 265-290 (2006).
- 60 Roop, R. M., 2nd, Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C. & Martin, D. W. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* **198**, 221-238, doi:10.1007/s00430-009-0123-8 (2009).
- 61 Roop, R. M., 2nd, Bellaire, B. H., Valderas, M. W. & Cardelli, J. A. Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* **52**, 621-630, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04017.x (2004).
- 62 Gee, J. M. *et al.* The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect Immun* **73**, 2873-2880, doi:10.1128/IAI.73.5.2873-2880.2005 (2005).
- 63 Steele, K. H., Baumgartner, J. E., Valderas, M. W. & Roop, R. M., 2nd. Comparative study of the roles of AhpC and KatE as respiratory antioxidants in *Brucella abortus* 2308. *J Bacteriol* **192**, 4912-4922, doi:10.1128/JB.00231-10 (2010).
- 64 Haine, V., Dozot, M., Dornand, J., Letesson, J. J. & De Bolle, X. NnrA is required for full virulence and regulates several *Brucella melitensis* denitrification genes. *J Bacteriol* **188**, 1615-1619, doi:10.1128/JB.188.4.1615-1619.2006 (2006).
- 65 Loisel-Meyer, S. *et al.* Requirement of norD for *Brucella suis* virulence in a murine model of in vitro and in vivo infection. *Infect Immun* **74**, 1973-1976, doi:10.1128/IAI.74.3.1973-1976.2006 (2006).
- 66 Barquero-Calvo, E. *et al.* *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One* **2**, e631, doi:10.1371/journal.pone.0000631 (2007).
- 67 Barquero-Calvo, E. *et al.* The differential interaction of *Brucella* and *ochrobactrum* with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens. *PLoS One* **4**, e5893, doi:10.1371/journal.pone.0005893 (2009).
- 68 Lapaque, N. *et al.* Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. *Cell Microbiol* **8**, 197-206, doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00609.x (2006).
- 69 Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A. & Moreno, E. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect Immun* **73**, 5137-5143, doi:10.1128/IAI.73.8.5137-5143.2005 (2005).
- 70 Palacios-Chaves, L. *et al.* *Brucella abortus* ornithine lipids are dispensable outer membrane components devoid of a marked pathogen-associated molecular pattern. *PLoS One* **6**, e16030, doi:10.1371/journal.pone.0016030 (2011).
- 71 Andersen-Nissen, E. *et al.* Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9247-9252, doi:10.1073/pnas.0502040102 (2005).
- 72 Conde-Alvarez, R. *et al.* Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite



- Brucella abortus*. *Cell Microbiol* **8**, 1322-1335, doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00712.x (2006).
- 73 Billard, E., Cazevieuille, C., Dornand, J. & Gross, A. High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infect Immun* **73**, 8418-8424, doi:10.1128/IAI.73.12.8418-8424.2005 (2005).
- 74 Salcedo, S. P. *et al.* *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog* **4**, e21, doi:10.1371/journal.ppat.0040021 (2008).
- 75 Archambaud, C. *et al.* Contrasting roles of macrophages and dendritic cells in controlling initial pulmonary *Brucella* infection. *Eur J Immunol* **40**, 3458-3471, doi:10.1002/eji.201040497 (2010).
- 76 Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E. & Gorvel, J. P. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol* **165**, 5202-5210 (2000).
- 77 Kenny, E. F. & O'Neill, L. A. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine* **43**, 342-349, doi:10.1016/j.cyto.2008.07.010 (2008).
- 78 Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826, doi:10.1038/nature06246 (2007).
- 79 Oliveira, S. C., de Oliveira, F. S., Macedo, G. C., de Almeida, L. A. & Carvalho, N. B. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect* **10**, 1005-1009, doi:10.1016/j.micinf.2008.07.005 (2008).
- 80 Moreno, E. & Moriyon, I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1-3, doi:10.1073/pnas.022622699 (2002).
- 81 Chaves-Olarte, E. *et al.* Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **4**, 663-676 (2002).
- 82 Porter, K. R., Claude, A. & Fullam, E. F. A Study of Tissue Culture Cells by Electron Microscopy : Methods and Preliminary Observations. *J Exp Med* **81**, 233-246 (1945).
- 83 Wickner, W. & Schekman, R. Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**, 1452-1456, doi:10.1126/science.1113752 (2005).
- 84 Bernales, S., Papa, F. R. & Walter, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 487-508, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120200 (2006).
- 85 Trombetta, E. S. & Parodi, A. J. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 649-676, doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153949 (2003).
- 86 Ellgaard, L. & Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-191, doi:10.1038/nrm1052 (2003).
- 87 Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529, doi:10.1038/nrm2199 (2007).
- 88 Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M. & Walter, P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18773-18784, doi:10.1073/pnas.0509487102 (2005).
- 89 Gardner, B. M. & Walter, P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* **333**, 1891-1894, doi:10.1126/science.1209126 (2011).
- 90 Lin, J. H. *et al.* IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**, 944-949, doi:10.1126/science.1146361 (2007).



- 91 Shen, X., Ellis, R. E., Sakaki, K. & Kaufman, R. J. Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS Genet* **1**, e37, doi:10.1371/journal.pgen.0010037 (2005).
- 92 Harding, H. P. *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* **11**, 619-633 (2003).
- 93 Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891 (2001).
- 94 Novoa, I. *et al.* Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* **22**, 1180-1187, doi:10.1093/emboj/cdg112 (2003).
- 95 Shaffer, A. L. *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**, 81-93, doi:10.1016/j.immuni.2004.06.010 (2004).
- 96 Travers, K. J. *et al.* Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258 (2000).
- 97 Harding, H. P. *et al.* Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**, 1099-1108 (2000).
- 98 Hollien, J. & Weissman, J. S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* **313**, 104-107, doi:10.1126/science.1129631 (2006).
- 99 Rutkowski, D. T. *et al.* Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* **4**, e374, doi:10.1371/journal.pbio.0040374 (2006).
- 100 Jordan, R., Wang, L., Graczyk, T. M., Block, T. M. & Romano, P. R. Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J Virol* **76**, 9588-9599 (2002).
- 101 Su, H. L., Liao, C. L. & Lin, Y. L. Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J Virol* **76**, 4162-4171 (2002).
- 102 Tardif, K. D., Mori, K. & Siddiqui, A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* **76**, 7453-7459 (2002).
- 103 Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A. & Ikehara, Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **263**, 18545-18552 (1988).
- 104 Isler, J. A., Skalet, A. H. & Alwine, J. C. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol* **79**, 6890-6899, doi:10.1128/JVI.79.11.6890-6899.2005 (2005).
- 105 Chou, J. & Roizman, B. Herpes simplex virus 1 gamma(1)34.5 gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5247-5251 (1994).
- 106 Zhang, H. M. *et al.* Coxsackievirus B3 infection activates the unfolded protein response and induces apoptosis through downregulation of p58IPK and activation of CHOP and SREBP1. *J Virol* **84**, 8446-8459, doi:10.1128/JVI.01416-09 (2010).
- 107 Yang, D. *et al.* In vitro mutational and inhibitory analysis of the cis-acting translational elements within the 5' untranslated region of coxsackievirus B3: potential





- targets for antiviral action of antisense oligomers. *Virology* **228**, 63-73, doi:10.1006/viro.1996.8366 (1997).
- 108 Danelishvili, L., McGarvey, J., Li, Y. J. & Bermudez, L. E. Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol* **5**, 649-660 (2003).
- 109 Majlessi, L. *et al.* Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of Mycobacterium tuberculosis on the interaction between mycobacteria and the host immune system. *J Immunol* **174**, 3570-3579 (2005).
- 110 Choi, H. H. *et al.* Endoplasmic reticulum stress response is involved in Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6-mediated apoptosis. *FEBS Lett* **584**, 2445-2454, doi:10.1016/j.febslet.2010.04.050 (2010).
- 111 Derrick, S. C. & Morris, S. L. The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol* **9**, 1547-1555, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00892.x (2007).
- 112 Yokouchi, M. *et al.* Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J Biol Chem* **283**, 4252-4260, doi:10.1074/jbc.M705951200 (2008).
- 113 Qin, Q. M. *et al.* RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1alpha in supporting Brucella replication. *PLoS Pathog* **4**, e1000110, doi:10.1371/journal.ppat.1000110 (2008).
- 114 Agaisse, H. *et al.* Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science* **309**, 1248-1251, doi:10.1126/science.1116008 (2005).
- 115 Philips, J. A., Rubin, E. J. & Perrimon, N. Drosophila RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science* **309**, 1251-1253, doi:10.1126/science.1116006 (2005).
- 116 Dorer, M. S., Kirton, D., Bader, J. S. & Isberg, R. R. RNA interference analysis of Legionella in Drosophila cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog* **2**, e34, doi:10.1371/journal.ppat.0020034 (2006).
- 117 Derre, I., Pypaert, M., Dautry-Varsat, A. & Agaisse, H. RNAi screen in Drosophila cells reveals the involvement of the Tom complex in Chlamydia infection. *PLoS Pathog* **3**, 1446-1458, doi:10.1371/journal.ppat.0030155 (2007).
- 118 Elwell, C. A., Ceesay, A., Kim, J. H., Kalman, D. & Engel, J. N. RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in Chlamydia trachomatis entry. *PLoS Pathog* **4**, e1000021, doi:10.1371/journal.ppat.1000021 (2008).
- 119 Lekstrom-Himes, J. & Xanthopoulos, K. G. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* **273**, 28545-28548 (1998).
- 120 Ramji, D. P. & Foka, P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* **365**, 561-575, doi:10.1042/BJ20020508 (2002).
- 121 Wang, X. Z. & Ron, D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* **272**, 1347-1349 (1996).
- 122 Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T. & Imagawa, M. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* **271**, 3891-3896 (1996).
- 123 Ron, D. & Habener, J. F. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* **6**, 439-453 (1992).
- 124 Ubeda, M. *et al.* Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol* **16**, 1479-1489 (1996).



- 125 Marciniak, S. J. *et al.* CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **18**, 3066-3077, doi:10.1101/gad.1250704 (2004).
- 126 Aldridge, J. E., Horibe, T. & Hoogenraad, N. J. Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS One* **2**, e874, doi:10.1371/journal.pone.0000874 (2007).
- 127 Ubeda, M., Vallejo, M. & Habener, J. F. CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 7589-7599 (1999).
- 128 Horndasch, M. *et al.* The C/EBP homologous protein CHOP (GADD153) is an inhibitor of Wnt/TCF signals. *Oncogene* **25**, 3397-3407, doi:10.1038/sj.onc.1209380 (2006).
- 129 Fornace, A. J., Jr., Alamo, I., Jr. & Hollander, M. C. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8800-8804 (1988).
- 130 Wang, X. Z. *et al.* Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* **16**, 4273-4280 (1996).
- 131 Oyadomari, S. & Mori, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **11**, 381-389, doi:10.1038/sj.cdd.4401373 (2004).
- 132 Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M. & Mori, K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* **366**, 585-594, doi:10.1042/BJ20020391 (2002).
- 133 Yoshida, H. *et al.* ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **20**, 6755-6767 (2000).
- 134 Ubeda, M. & Habener, J. F. CHOP gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element. *Nucleic Acids Res* **28**, 4987-4997 (2000).
- 135 Wang, Y. *et al.* Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* **275**, 27013-27020, doi:10.1074/jbc.M003322200 (2000).
- 136 Scheuner, D. *et al.* Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* **7**, 1165-1176 (2001).
- 137 Sylvester, S. L., ap Rhys, C. M., Luethy-Martindale, J. D. & Holbrook, N. J. Induction of GADD153, a CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, during the acute phase response in rats. Evidence for the involvement of C/EBPs in regulating its expression. *J Biol Chem* **269**, 20119-20125 (1994).
- 138 Fawcett, T. W., Martindale, J. L., Guyton, K. Z., Hai, T. & Holbrook, N. J. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J* **339** ( Pt 1), 135-141 (1999).
- 139 Bruhat, A. *et al.* Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol* **20**, 7192-7204 (2000).
- 140 Carbon tetrachloride. *Rep Carcinog* **12**, 86-89 (2011).
- 141 Chen, B. P., Wolfgang, C. D. & Hai, T. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol Cell Biol* **16**, 1157-1168 (1996).



- 142 Wolfgang, C. D., Chen, B. P., Martindale, J. L., Holbrook, N. J. & Hai, T. gadd153/Chop10, a potential target gene of the transcriptional repressor ATF3. *Mol Cell Biol* **17**, 6700-6707 (1997).
- 143 Pirot, P. *et al.* Transcriptional regulation of the endoplasmic reticulum stress gene chop in pancreatic insulin-producing cells. *Diabetes* **56**, 1069-1077, doi:10.2337/db06-1253 (2007).
- 144 Nikulina, M. A. *et al.* The JNK binding domain of islet-brain 1 inhibits IL-1 induced JNK activity and apoptosis but not the transcription of key proapoptotic or protective genes in insulin-secreting cell lines. *Cytokine* **24**, 13-24 (2003).
- 145 Morton, S., Davis, R. J., McLaren, A. & Cohen, P. A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *EMBO J* **22**, 3876-3886, doi:10.1093/emboj/cdg388 (2003).
- 146 Kawai, T., Matsumoto, M., Takeda, K., Sanjo, H. & Akira, S. ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol* **18**, 1642-1651 (1998).
- 147 Yamazaki, T. *et al.* Regulation of the human CHOP gene promoter by the stress response transcription factor ATF5 via the AARE1 site in human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci* **87**, 294-301, doi:10.1016/j.lfs.2010.07.006 (2010).
- 148 Bruhat, A. *et al.* Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* **272**, 17588-17593 (1997).
- 149 Jousse, C. *et al.* Inhibition of CHOP translation by a peptide encoded by an open reading frame localized in the chop 5'UTR. *Nucleic Acids Res* **29**, 4341-4351 (2001).
- 150 Ubeda, M. & Habener, J. F. CHOP transcription factor phosphorylation by casein kinase 2 inhibits transcriptional activation. *J Biol Chem* **278**, 40514-40520, doi:10.1074/jbc.M306404200 (2003).
- 151 Matsumoto, M., Minami, M., Takeda, K., Sakao, Y. & Akira, S. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett* **395**, 143-147 (1996).
- 152 Maytin, E. V., Ubeda, M., Lin, J. C. & Habener, J. F. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp Cell Res* **267**, 193-204, doi:10.1006/excr.2001.5248 (2001).
- 153 Barone, M. V., Crozat, A., Tabae, A., Philipson, L. & Ron, D. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev* **8**, 453-464 (1994).
- 154 Oyadomari, S. *et al.* Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10845-10850, doi:10.1073/pnas.191207498 (2001).
- 155 Zinszner, H. *et al.* CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **12**, 982-995 (1998).
- 156 Oyadomari, S. *et al.* Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* **109**, 525-532, doi:10.1172/JCI14550 (2002).
- 157 Chiribau, C. B., Gaccioli, F., Huang, C. C., Yuan, C. L. & Hatzoglou, M. Molecular symbiosis of CHOP and C/EBP beta isoform LIP contributes to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **30**, 3722-3731, doi:10.1128/MCB.01507-09 (2010).
- 158 McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y. & Holbrook, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and



- perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**, 1249-1259, doi:10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001 (2001).
- 159 Puthalakath, H. *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**, 1337-1349, doi:10.1016/j.cell.2007.04.027 (2007).
- 160 Fu, H. Y. *et al.* Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* **122**, 361-369, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.917914 (2010).
- 161 Sok, J. *et al.* CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol* **19**, 495-504 (1999).
- 162 Antonsson, B. *et al.* Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372 (1997).
- 163 Kothakota, S. *et al.* Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-298 (1997).
- 164 Seimon, T. A., Obstfeld, A., Moore, K. J., Golenbock, D. T. & Tabas, I. Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19794-19799, doi:10.1073/pnas.0609671104 (2006).
- 165 Yagi, A. *et al.* GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription. *J Cell Biochem* **90**, 1242-1249, doi:10.1002/jcb.10711 (2003).
- 166 Yamaguchi, H. & Wang, H. G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* **279**, 45495-45502, doi:10.1074/jbc.M406933200 (2004).
- 167 Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K. & Hayashi, H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* **24**, 1243-1255, doi:10.1038/sj.emboj.7600596 (2005).
- 168 Nakayama, Y. *et al.* Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway. *J Biochem* **147**, 471-483, doi:10.1093/jb/mvp189 (2010).
- 169 Mattart, L. *et al.* The peroxynitrite donor 3-morpholinosydnonimine activates Nrf2 and the UPR leading to a cytoprotective response in endothelial cells. *Cell Signal* **24**, 199-213, doi:10.1016/j.cellsig.2011.09.002 (2012).
- 170 Halterman, M. W. *et al.* The endoplasmic reticulum stress response factor CHOP-10 protects against hypoxia-induced neuronal death. *J Biol Chem* **285**, 21329-21340, doi:10.1074/jbc.M109.095299 (2010).
- 171 Kelly, D. *et al.* Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* **5**, 104-112, doi:10.1038/ni1018 (2004).
- 172 Park, S. H. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-activated C/EBP homologous protein enhances nuclear factor-kappaB signals via repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **285**, 35330-35339, doi:10.1074/jbc.M110.136259 (2010).
- 173 Akira, S. & Kishimoto, T. NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol* **65**, 1-46 (1997).
- 174 Gao, H. & Schwartz, R. C. C/EBPzeta (CHOP/Gadd153) is a negative regulator of LPS-induced IL-6 expression in B cells. *Mol Immunol* **47**, 390-397, doi:10.1016/j.molimm.2009.09.002 (2009).
- 175 Hattori, T., Ohoka, N., Hayashi, H. & Onozaki, K. C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform. *FEBS Lett* **541**, 33-39 (2003).
- 176 Scott, A. M. & Saleh, M. The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. *Cell Death Differ* **14**, 23-31, doi:10.1038/sj.cdd.4402026 (2007).





- 177 Blumenthal, A. *et al.* The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* **108**, 965-973, doi:10.1182/blood-2005-12-5046 (2006).
- 178 Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M. & Perrimon, N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**, 1644-1646, doi:10.1126/science.1071549 (2002).
- 179 O'Neill, L. A., Sheedy, F. J. & McCoy, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **11**, 163-175, doi:10.1038/nri2957 (2011).
- 180 Cremer, T. J. *et al.* MiR-155 induction by *F. novicida* but not the virulent *F. tularensis* results in SHIP down-regulation and enhanced pro-inflammatory cytokine response. *PLoS One* **4**, e8508, doi:10.1371/journal.pone.0008508 (2009).
- 181 Schnitger, A. K. *et al.* *Listeria monocytogenes* Infection in Macrophages Induces Vacuolar-Dependent Host miRNA Response. *PLoS One* **6**, e27435, doi:10.1371/journal.pone.0027435 (2011).
- 182 Behrman, S., Acosta-Alvear, D. & Walter, P. A CHOP-regulated microRNA controls rhodopsin expression. *J Cell Biol* **192**, 919-927, doi:10.1083/jcb.201010055 (2011).
- 183 Kuma, A. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036, doi:10.1038/nature03029 (2004).
- 184 Delaive, E., Arnould, T., Raes, M. & Renard, P. A sensitive three-step protocol for fluorescence-based Western blot detection. *J Immunol Methods* **334**, 51-58, doi:10.1016/j.jim.2008.02.007 (2008).
- 185 Elbashir, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498, doi:10.1038/35078107 (2001).
- 186 Pratt, A. J. & MacRae, I. J. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* **284**, 17897-17901, doi:10.1074/jbc.R900012200 (2009).
- 187 Connor, J. H., Weiser, D. C., Li, S., Hallenbeck, J. M. & Shenolikar, S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol* **21**, 6841-6850, doi:10.1128/MCB.21.20.6841-6850.2001 (2001).
- 188 Halling, S. M. *et al.* Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* **187**, 2715-2726, doi:10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005 (2005).
- 189 Chain, P. S. *et al.* Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun* **73**, 8353-8361, doi:10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005 (2005).
- 190 Gonzalez, D. *et al.* Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One* **3**, e2760, doi:10.1371/journal.pone.0002760 (2008).
- 191 Vizcaino, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S. & Fernandez-Lago, L. Molecular characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *Brucella abortus* strains: evidence for a locus involved in the synthesis of a polysaccharide. *Infect Immun* **67**, 2700-2712 (1999).
- 192 Vatter, K. M. & Wek, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11269-11274, doi:10.1073/pnas.0400541101 (2004).
- 193 Zeng, L. *et al.* ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis. *EMBO J* **23**, 950-958, doi:10.1038/sj.emboj.7600106 (2004).
- 194 Moreno, E., Berman, D. T. & Boettcher, L. A. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun* **31**, 362-370 (1981).



- 195 Lapaque, N., Muller, A., Alexopoulou, L., Howard, J. C. & Gorvel, J. P. Brucella abortus induces Irgm3 and Irga6 expression via type-I IFN by a MyD88-dependent pathway, without the requirement of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9. *Microb Pathog* **47**, 299-304, doi:10.1016/j.micpath.2009.09.005 (2009).
- 196 Taylor, G. A. IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell Microbiol* **9**, 1099-1107, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00916.x (2007).
- 197 Zhu, H. & Fan, G. C. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis* **1**, 138-149 (2011).
- 198 Thery, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**, 581-593, doi:10.1038/nri2567 (2009).
- 199 Hofer, M. & Pospisil, M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' results. *Int J Immunopharmacol* **19**, 607-609 (1997).
- 200 Keitel, V., Kubitz, R. & Haussinger, D. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* **14**, 5620-5629 (2008).
- 201 Sashinami, H. *et al.* Virulence factor p60 of *Listeria monocytogenes* modulates innate immunity by inducing tumor necrosis factor alpha. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 100-107, doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00666.x (2010).
- 202 Shao, C., Lawrence, M. C. & Cobb, M. H. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) expression by interleukin-1 beta in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* **285**, 19710-19719, doi:10.1074/jbc.M109.087486 (2010).
- 203 Endo, M., Mori, M., Akira, S. & Gotoh, T. C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Immunol* **176**, 6245-6253 (2006).
- 204 Kagan, J. C. & Roy, C. R. Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**, 945-954, doi:10.1038/ncb883 (2002).
- 205 Wek, R. C., Jiang, H. Y. & Anthony, T. G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**, 7-11, doi:10.1042/BST20060007 (2006).
- 206 Naik, E. & Dixit, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* **208**, 417-420, doi:10.1084/jem.20110367 (2011).
- 207 Stavru, F., Bouillaud, F., Sartori, A., Ricquier, D. & Cossart, P. *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3612-3617, doi:10.1073/pnas.1100126108 (2011).
- 208 West, A. P., Shadel, G. S. & Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **11**, 389-402, doi:10.1038/nri2975 (2011).
- 209 Bulua, A. C. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* **208**, 519-533, doi:10.1084/jem.20102049 (2011).
- 210 Chen, F. & He, Y. Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough *Brucella abortus*. *PLoS One* **4**, e6830, doi:10.1371/journal.pone.0006830 (2009).
- 211 Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S. & Mori, M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* **11**, 390-402, doi:10.1038/sj.cdd.4401369 (2004).
- 212 Altman, B. J. *et al.* Autophagy provides nutrients but can lead to Chop-dependent induction of Bim to sensitize growth factor-deprived cells to apoptosis. *Mol Biol Cell* **20**, 1180-1191, doi:10.1091/mbc.E08-08-0829 (2009).



- 213 Bromati, C. R. *et al.* UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R92-100, doi:10.1152/ajpregu.00169.2010 (2011).
- 214 Oh, Y. T. *et al.* ERK/ribosomal S6 kinase (RSK) signaling positively regulates death receptor 5 expression through co-activation of CHOP and Elk1. *J Biol Chem* **285**, 41310-41319, doi:10.1074/jbc.M110.153775 (2010).
- 215 Neumann, J. *et al.* Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *FASEB J* **24**, 4599-4612, doi:10.1096/fj.10-160994 (2010).
- 216 van der Sar, A. M., Spaink, H. P., Zakrzewska, A., Bitter, W. & Meijer, A. H. Specificity of the zebrafish host transcriptome response to acute and chronic mycobacterial infection and the role of innate and adaptive immune components. *Mol Immunol* **46**, 2317-2332, doi:10.1016/j.molimm.2009.03.024 (2009).
- 217 Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H. & Moon, R. T. Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* **13**, 680-685 (2003).
- 218 Jordans, H. G. & DeBruin, K. D. Granulomas in *Brucella melitensis* infection. *Ann Intern Med* **92**, 264-265 (1980).
- 219 Barrett, C. L., Cho, B. K. & Palsson, B. O. Sensitive and accurate identification of protein-DNA binding events in ChIP-chip assays using higher order derivative analysis. *Nucleic Acids Res* **39**, 1656-1665, doi:10.1093/nar/gkq848 (2011).
- 220 Northrup, D. L. & Zhao, K. Application of ChIP-Seq and related techniques to the study of immune function. *Immunity* **34**, 830-842, doi:10.1016/j.immuni.2011.06.002 (2011).

## 2. Bibliographie associée aux figures

- 1 Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. & Akritidis, N. *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2229-2236, doi:10.1007/s00018-006-6311-4 (2006).
- 2 Tseng, T. T., Tyler, B. M. & Setubal, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9 Suppl 1**, S2, doi:10.1186/1471-2180-9-S1-S2 (2009).
- 3 Lopez-Goni, I. *et al.* Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* **90**, 329-339 (2002).
- 4 Alvarez-Martinez, C. E. & Christie, P. J. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 775-808, doi:10.1128/MMBR.00023-09 (2009).
- 5 West, A. H. & Stock, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-376 (2001).
- 6 Viadas, C. *et al.* Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One* **5**, e10216, doi:10.1371/journal.pone.0010216 (2010).
- 7 Backert, S. & Meyer, T. F. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**, 207-217, doi:10.1016/j.mib.2006.02.008 (2006).
- 8 O'Callaghan, D. *et al.* A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* **33**, 1210-1220 (1999).



- 9 Baron, C. & Coombes, B. Targeting bacterial secretion systems: benefits of disarmament in the microcosm. *Infect Disord Drug Targets* **7**, 19-27 (2007).
- 10 Paschos, A. *et al.* An in vivo high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation. *Infect Immun* **79**, 1033-1043, doi:10.1128/IAI.00993-10 (2011).
- 11 Mancias, J. D. & Goldberg, J. Exiting the endoplasmic reticulum. *Traffic* **6**, 278-285, doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00279.x (2005).
- 12 Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V. & Oliveira, S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* **5**, 13, doi:10.1186/1475-2859-5-13 (2006).
- 13 Oliveira, S. C., de Oliveira, F. S., Macedo, G. C., de Almeida, L. A. & Carvalho, N. B. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect* **10**, 1005-1009, doi:10.1016/j.micinf.2008.07.005 (2008).
- 14 Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529, doi:10.1038/nrm2199 (2007).
- 15 Bernales, S., Papa, F. R. & Walter, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 487-508, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120200 (2006).
- 16 Cox, J. S., Shamu, C. E. & Walter, P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**, 1197-1206 (1993).
- 17 Shamu, C. E. & Walter, P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* **15**, 3028-3039 (1996).
- 18 Calfon, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96, doi:10.1038/415092a (2002).
- 19 Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891 (2001).
- 20 Berger, B. J. *et al.* High levels of the molecular chaperone Mdg1/ERdj4 reflect the activation state of endothelial cells. *Exp Cell Res* **290**, 82-92 (2003).
- 21 Lee, A. H., Iwakoshi, N. N. & Glimcher, L. H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **23**, 7448-7459 (2003).
- 22 Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P. & Paganetti, P. Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* **299**, 1397-1400, doi:10.1126/science.1079474 (2003).
- 23 Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K. & Brewer, J. W. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **167**, 35-41, doi:10.1083/jcb.200406136 (2004).
- 24 Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**, 3787-3799 (1999).
- 25 Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086, doi:10.1126/science.1209038 (2011).
- 26 Ye, J. *et al.* ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6**, 1355-1364 (2000).





- 27 Harding, H. P., Zhang, Y. & Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274, doi:10.1038/16729 (1999).
- 28 Harding, H. P. *et al.* Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1832-1837, doi:10.1073/pnas.0809632106 (2009).
- 29 Lu, P. D., Harding, H. P. & Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* **167**, 27-33, doi:10.1083/jcb.200408003 (2004).
- 30 Vattem, K. M. & Wek, R. C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11269-11274, doi:10.1073/pnas.0400541101 (2004).
- 31 Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332, doi:10.1038/35014014 (2000).
- 32 Jousse, C. *et al.* Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* **163**, 767-775, doi:10.1083/jcb.200308075 (2003).
- 33 Connor, J. H., Weiser, D. C., Li, S., Hallenbeck, J. M. & Shenolikar, S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol* **21**, 6841-6850, doi:10.1128/MCB.21.20.6841-6850.2001 (2001).
- 34 Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. & Ron, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* **153**, 1011-1022 (2001).
- 35 Brush, M. H., Weiser, D. C. & Shenolikar, S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **23**, 1292-1303 (2003).
- 36 Ma, Y. & Hendershot, L. M. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **278**, 34864-34873, doi:10.1074/jbc.M301107200 (2003).
- 37 Lin, J. H. *et al.* IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**, 944-949, doi:10.1126/science.1146361 (2007).
- 38 Isler, J. A., Skalet, A. H. & Alwine, J. C. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol* **79**, 6890-6899, doi:10.1128/JVI.79.11.6890-6899.2005 (2005).
- 39 Zhang, H. M. *et al.* Coxsackievirus B3 infection activates the unfolded protein response and induces apoptosis through downregulation of p58IPK and activation of CHOP and SREBP1. *J Virol* **84**, 8446-8459, doi:10.1128/JVI.01416-09 (2010).
- 40 Oyadomari, S. & Mori, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **11**, 381-389, doi:10.1038/sj.cdd.4401373 (2004).
- 41 Roberts, D. M., Slep, K. C. & Peifer, M. It takes more than two to tango: Dishevelled polymerization and Wnt signaling. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 463-465, doi:10.1038/nsmb0607-463 (2007).

